

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Chieko OSUMI et al.

GAU:

SERIAL NO: New Application

EXAMINER:

FILED: Herewith

FOR: RAFFINOSE SYNTHASE GENE, METHOD OF PRODUCING RAFFINOSE, AND TRANSGENIC PLANT
REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☒ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number 08/846,234, filed April 28, 1997, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	8-107682	April 26, 1996
Japan	8-198079	July 26, 1996

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☒ were filed in prior application Serial No. 08/846,234 filed April 28, 1997.
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
 - ☐ are submitted herewith
 - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Olbon
Registration No. 24,618

James J. Kelly, Ph.D.
Registration No. 41,504



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

Docket No. 195378US0DIV

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

INVENTOR(S) Chieko OSUMI et al.

SERIAL NO: New Application

FILING DATE: Herewith

FOR: RAFFINOSE SYNTHASE GENE, METHOD OF PRODUCING RAFFINOSE, AND TRANSGENIC PLANT



FEE TRANSMITTAL

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

FOR	NUMBER FILED	NUMBER EXTRA	RATE	CALCULATIONS
TOTAL CLAIMS	24 - 20 =	4	× \$18 =	\$72.00
INDEPENDENT CLAIMS	7 - 3 =	4	× \$78 =	\$312.00
<input type="checkbox"/> MULTIPLE DEPENDENT CLAIMS (If applicable)			+ \$260 =	\$0.00
<input type="checkbox"/> LATE FILING OF DECLARATION			+ \$130 =	\$0.00
BASIC FEE				\$690.00
TOTAL OF ABOVE CALCULATIONS				\$1,074.00
<input type="checkbox"/> REDUCTION BY 50% FOR FILING BY SMALL ENTITY				\$0.00
<input type="checkbox"/> FILING IN NON-ENGLISH LANGUAGE			+ \$130 =	\$0.00
<input type="checkbox"/> RECORDATION OF ASSIGNMENT			+ \$40 =	\$0.00
TOTAL				\$1,074.00

- ☐ Please charge Deposit Account No. 15-0030 in the amount of _____ A duplicate copy of this sheet is enclosed.
- ☒ A check in the amount of **\$1,074.00** to cover the filing fee is enclosed.
- ☒ The Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees which may be required for the papers being filed herewith and for which no check is enclosed herewith, or credit any overpayment to Deposit Account No. 15-0030. A duplicate copy of this sheet is enclosed.

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Date: _____

9/29/00

Norman F. Oblon
Registration No. 24,618

James J. Kelly, Ph.D.
Registration No. 41,504



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 11/98)

#4

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the Application of

Chieko OSUMI, et al.

Serial No. 08/846,234

Filed: April 28, 1997

For: RAFFINOSE SYNTHASE GENE, METHOD FOR PRODUCING
RAFFINOSE, AND TRANSGENIC PLANT

VERIFICATION OF TRANSLATION

Honorable Commissioner of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

Sir:

I, Yoshiyuki KAWAGUCHI, of c/o TOYAMA, MATSUKURA,
KAWAGUCHI & ONO, Yokoyama Building 6th Floor, 4-10, Higashi
Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo, 103 Japan, declare:-

- (1) that I know well both Japanese and English languages;
- (2) that I translated the attached Text of Specification
and Claims from Japanese into English;
- (3) that the attached English translation is a true and
correct translation of the Japanese text of specification and
claims as filed in the United States Patent and Trademark
Office on April 28, 1997 under Serial No. 08/846,234 to the
best of my knowledge and belief; and
- (4) that all statements made of my own knowledge are true
and that all statements made on information and belief are
believed to be true, and further that these statements are
made with the knowledge that willful false statements and the
like are punishable by fine or imprisonment, or both, under 18
USC 1001, and that such false statements may jeopardize the
validity of the application or any patent issuing thereon.

Signed at Tokyo, Japan, this 1st day of September, 1997.


Yoshiyuki KAWAGUCHI

0965208-092900

Docket No. 10-851-0

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Chieko OSUMI, et al.

SERIAL NO. NEW APPLICATION

FILED: HEREWITH

FOR: RAFFINOSE SYNTHETASE GENE, METHOD OF PRODUCING RAFFINOSE AND
TRANSGENIC PLANT

CERTIFIED STATEMENT RE FILING IN FOREIGN LANGUAGE

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

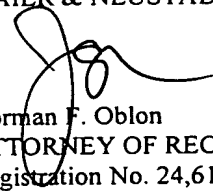
Sir:

It is hereby certified that the subject application is being filed in a foreign language, in accordance with
the provisions of 37 CFR 1.52(d).

A certified English translation, and a suitable amendment placing the application and claims thereof
into proper U.S. format if needed, will be filed in due course.

Respectfully submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.


Norman F. Oblon
ATTORNEY OF RECORD
Registration No. 24,618

James J. Kelly, P.L.D.
Reg. No. 411,364

Fourth Floor
1755 Jefferson Davis Highway
Arlington, Virginia 22202
(703) 413-3000
Fax: (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)



1638
Zaphmaet

明細書

ラフィノース合成酵素遺伝子、ラフィノースの製造法及び形質転換植物

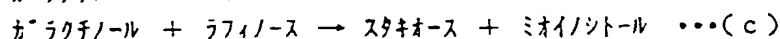
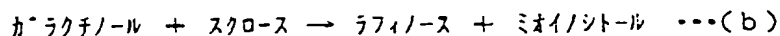
技術分野

本発明は、ラフィノース合成酵素、ラフィノース合成酵素もしくはラフィノース合成酵素を含む細胞抽出物を用いたラフィノースを合成する方法、ラフィノース合成酵素をコードするDNA、及びこのDNAの植物における利用に関する。ラフィノースは、ビフィズス菌増殖活性を有し食品原料として、あるいは臓器保存液などの医薬品として様々な分野で利用されている。

背景技術

ラフィノースは、スクロースのグルコシル基にガラクトースが α -1, 6結合したラフィノース族オリゴ糖の一つである。ラフィノース族オリゴ糖には、ラフィノースの他に、ガラクトースが2つ結合したスタキオース、3つ結合したベルバスコースなどがある。これらの糖は、豆類、ナタネ、綿実など様々な植物の種子中の貯蔵糖と、キュウリやメロンなどウリ科植物にみられる転流糖として、また耐冷性を獲得したロゼット葉、甜菜（サトウダイコン）など植物に広く存在する。

ラフィノース族オリゴ糖の生合成は、次のようであり、



各々の反応は（a）ガラクチノール合成酵素（GS : EC2. 4. 1. 123）、（b）ラフィノース合成酵素（RS : EC2. 4. 1. 82）（c）スタキオース合成酵素（STS : EC2. 4. 1. 67）により触媒される。

現在、ラフィノースは、甜菜から抽出され、スクロース精製過程において分離精製されている。しかし、ラフィノースはスクロースの結晶性を低下させるので、甜菜は低ラフィノースを目標に育種、改良され、甜菜中のラフィノース含量は0. 03%から0. 16%（Enzyme Microb. Technol., Vol. 4 May, 130-135(1982)）と低い。従って、このような低含量の甜菜より効率的にラフィノースを得るのは容易ではない。

先に述べたように、ラフィノースは、ダイズをはじめとするマメ科の成熟種子に含まれているほか、甜菜、あるいはキュウリなどのウリ科植物に含まれている。ダイズの成熟種子中には、ダイズオリゴ糖として、スクロース（含有量約5%）、スタキオース（同約4%）、ラフィノース（同約1%）が含まれている。これらのダイズオリゴ糖は、脱脂ダイズから除蛋白した画分に回収され、濃縮後、機能性食品などに利用されている。しかし、オリゴ糖全体の中でもラフィノースは10%であり、量的にも少ない。

一方、ラフィノースの酵素的合成法も報告されている（Trends in Glycoscience and Glycotechnology 7. 34, 149-158(1995)）。これは、 α -ガラクトシダーゼの縮合反応によ

りガラクトビオースを合成し、さらにこのガラクトビオースをガラクトシル基の供与体としてスクロースにガラクトシル転移反応により転移させて、ラフィノースを合成する方法である。しかし、この反応は、乳糖加水分解物 1.9 kg よりガラクトビオースが 350 g 合成され、ガラクトビオース 190 g とスクロース 760 g よりラフィノース 100 g が得られる反応であり、生成するラフィノースの収率が低く、効率的な合成法には至っていない。

以上のような方法の他に、生合成系酵素遺伝子の形質転換により、ラフィノース含量の高い植物を育種する方法も考えられる。例えば、Kerrらはガラクチノール合成酵素遺伝子をクローニングし、ナタネを形質転換した(W093/02196)。しかし、その結果、GS活性は増加したが、ラフィノース族オリゴ糖は逆に低下し、ガラクチノール合成酵素を導入することによるラフィノース族オリゴ糖の生合成を増加させるという目的は達成されなかった。したがって、植物のラフィノース族オリゴ糖の含量を増加させるする方法は提供されていない。

一方、ラフィノース族オリゴ糖を低減化することも求められている。先に述べたように、ラフィノース族オリゴ糖は、主に、ダイズなど豆類、ナタネ、綿実など様々な植物の種子中の貯蔵糖と、キュウリやメロンなどウリ科植物にみられる転流糖として、また、耐冷性を獲得したロゼット菜、甜菜、など植物に広く存在するが、ダイズ、ナタネ、綿菜などの搾油されたミールには、これらのラフィノース族オリゴ糖が含まれている。これらミールのほとんどは、飼料として利用されているが、 α -ガラクトシダーゼを持たないヒトや動物は、直接ラフィノース族オリゴ糖を消化することはできない。さらに、ラフィノース族オリゴ糖は、腸内細菌が質化しガスを発生させるなどにより、飼料の代謝エネルギー効率を低下させることが知られており、飼料中のラフィノース族オリゴ糖を除くことで、トリの飼料効率が上昇したと報告されている(Coon, Proceeding Soybean Utilization Alternatives, University of Minnesota, 203-211 (1989))。このようなことから、ラフィノース族オリゴ糖の減少したダイズ、ナタネ、綿実などの飼料作物が望まれている。

また、これらの植物の中では、油の含量を多くする育種がなされてきた。光合成産物は、油脂、蛋白質、ラフィノース族オリゴ糖を含む糖質に分配されている。ダイズでは、油脂量と糖質量に逆の相関があることが報告されている。ラフィノース族オリゴ糖の生成を抑制することにより、同じ光合成の能力のダイズにおいて油脂含量を増加させることが期待できる。

以上の観点から、Kerrらは、交配選抜育種により、ラフィノース族オリゴ糖が80%から90%低下した低ラフィノース族オリゴ糖ダイズ品種を作出したと報告している(W093/00742)。しかしこれは、品種の作出であり、栽培適性や、耐病性などに対応した様々な品種に応用できるものではない。また、広く様々な植物に適用できるものではない。

甜菜、サトウキビなどにも含まれるラフィノースは、砂糖の結晶性を低下させることが知られている。従って、ラフィノースの生成がなければ、これら植物での砂糖の生成効率が上がることを期待できるが、ラフィノースを含まないテンサイは作出されていない。

上述したように、従来精製されたラフィノース合成酵素は、酵素活性として確認されているのみであり、酵素の同定はなされていなかった。また、その活性も低いものであり、活性の高いラフィノース合成酵素が望まれていた。また、従米のラフィノースの製造法は

収率が低く、効率のよいラフィノースの製造法が望まれていた。その一方で、ラフィノース族オリゴ糖が低減化された植物を育種することも望まれている。

発明の開示

本発明は、上記観点からなされたものであり、活性の高いラフィノース合成酵素及びこれをコードするDNAの取得、効率的なラフィノースの酵素的合成法、及びラフィノース合成酵素をコードするDNAの植物における利用法を提供することを課題とする。

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、キュウリからラフィノース合成酵素を精製することに成功した。また、このラフィノース合成酵素をコードする遺伝子をクローニングするために、本発明者らは鋭意検討を行った。その結果、キュウリのラフィノース合成酵素ペプチド断片のアミノ酸配列より推定した塩基配列をもとに一本鎖DNAを化学合成し、この一本鎖合成DNAをプライマーとして、キュウリから抽出したpoly(A)⁺RNAより作製したcDNAを鋳型としてPCRを行い、ラフィノース合成酵素遺伝子に特異的なDNA断片を得た。さらに、このDNA断片をプローブとしてキュウリ由来cDNAライブラリーに対しハイブリダイゼーションを行い、ラフィノース合成酵素遺伝子を単離する方法を採用し、ラフィノース合成酵素遺伝子を単離した。この単離したラフィノース合成酵素遺伝子断片を用い、植物で発現可能な制御領域を有するキメラ遺伝子を作成し、植物を形質転換した。さらに、導入したラフィノース合成酵素遺伝子により、内在性ラフィノース合成酵素の機能を制御し、ラフィノース族オリゴ糖の低減化した植物を作出するに至った。

すなわち本発明は、下記性質を有するラフィノース合成酵素を提供する。

(1) 作用及び基質特異性：スクロースとガラクトノールからラフィノースを生成する。

(2) 至適pH：約6～8

(3) 至適温度：約35～40℃

(4) 分子量：

①ゲルろ過クロマトグラフィーにより測定される分子量：約75kDa～95kDa

②ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Native PAGE)により測定される分子量：約90kDa～100kDa

③還元条件下におけるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により測定される分子量：約90kDa～100kDa

(5) 阻害：

ヨードアセトアミド、N-エチルマレイミド、ミオイノシトールにより阻害される。

本発明は、上記ラフィノース合成酵素の具体的な態様として、アミノ酸配列中に、配列表配列番号1～3に示す各アミノ酸配列を含むラフィノース合成酵素を提供する。

また、本発明は、下記(A)又は(B)に示すタンパク質であるラフィノース合成酵素を提供する。

(A) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、スクロースとガラクトノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質。

本発明はまた、スクロース及びガラクトノールに上記ラフィノース合成酵素を作用させてラフィノースを生成させることを特徴とするラフィノースの製造方法を提供する。

本発明はさらに、上記ラフィノース合成酵素をコードするDNA、及び、

下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNAを提供する。

(A) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、スクロースとガラクトノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質。

本発明は、上記DNAの具体的態様として、下記(a)又は(b)に示すDNAを提供する。

(a) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号57～2408からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号57～2408からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつスクロースとガラクトノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

さらに本発明は、ラフィノース合成酵素遺伝子又はその一部と、植物細胞で発現可能な転写制御領域とを含むキメラ遺伝子、及び、このキメラ遺伝子で形質転換された植物を提供する。

また本発明は、前記キメラ遺伝子で植物を形質転換し、この遺伝子を植物細胞内で発現させることにより、前記植物のラフィノース族オリゴ糖含量を変化させる方法を提供する。

以下、上記(1)～(5)に記載の性質を有するラフィノース合成酵素、又は、上記(A)及び(B)のタンパク質であるラフィノース合成酵素を、単に「ラフィノース合成酵素」ということがある。また、ラフィノース合成酵素をコードするDNA、又はラフィノース合成酵素をコードし、さらに非翻訳領域を含むDNAを、「ラフィノース合成酵素遺伝子」ということがある。

以下、本発明を詳細に説明する。

<1> 本発明のラフィノース合成酵素

本発明のラフィノース合成酵素は、下記性質を有する。

(1) 作用及び基質特異性：スクロースとガラクトノールからラフィノースを生成する。

(2) 至適pH：約6～8

(3) 至適温度：約35～40℃

(4) 分子量：

①ゲルろ過クロマトグラフィーにより測定される分子量：約75kDa～95kDa

②ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Native PAGE)により測定される分子量：約90kDa～100kDa

③還元条件下におけるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により測定される分子量：約90kDa～100kDa

(5) 阻害：

ヨードアセトアミド、N-エチルマレイミド、ミオイノシトールにより阻害される。

上記の性質を有するラフィノース合成酵素は、キュウリ本葉より単離、精製されたものであり、発明者により初めて同定された。このキュウリ由来のラフィノース合成酵素は、後記実施例に示すように、その酵素タンパク質のアミノ酸配列中に、配列表配列番号 1 ~ 3 に示す各アミノ酸配列を含んでいる。また、その全アミノ酸配列を、配列表配列番号 5 に示す。

ラフィノース合成酵素は、ウリ科植物、例えばメロン (*Cucumis melo*)、キュウリ (*Cucumis sativas*) などの植物から得られる。特に、これらの植物の葉、特に葉脈系、及び種子等の組織がラフィノース合成酵素の含有量が多い。

次に、本発明のラフィノース合成酵素の製造法の例として、キュウリからラフィノース合成酵素を単離・精製する方法を説明する。

播種後 6 ~ 10 週間のキュウリ本葉より、葉脈系を集め、液体窒素下で乳鉢等を用いて磨砕し、緩衝液を加えて蛋白質を抽出する。その際、ラフィノース合成酵素の分解、失活等を防ぐための物質、例えば PMSF (フェニルメタンスルフォニルフルオリド) 等のプロテアーゼ阻害剤や、ポリクラルール AT (セルバ (S e r v a) 社製) 等を加えてもよい。この抽出液から濾過及び遠心分離により不溶物を除去し、粗抽出液を得る。

上記のようにして得られる粗抽出液を、通常のタンパク質の精製法、例えば、陰イオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル濾過、塩析等を組み合わせて分画することによって、ラフィノース合成酵素を精製することができる。

陰イオン交換クロマトグラフィーは、例えば、Hi Trap Q (ファルマシア社製) 等の強塩基性陰イオン交換体や、DEAE-TOYOPEARL (東ソー社製) 等の弱塩基性陰イオン交換体を充填したカラムを用いることによって行うことができる。ラフィノース合成酵素を含む抽出液をこれらのカラムに通液させて酵素をカラムに吸着させ、カラムを洗浄した後に、高塩濃度の緩衝液を用いて酵素を溶出させる。その際、段階的に塩濃度を高めてもよく、濃度勾配をかけてもよい。例えば、Hi Trap Q カラムを用いた場合には、カラムに吸着したラフィノース合成酵素活性は、0.3 M 程度の NaCl で溶出される。また、DEAE-TOYOPEARL では溶出液として 0.05 M ~ 0.35 M の NaCl 濃度勾配が、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーでは溶出液として 0.01 M ~ 0.3 M のリン酸濃度勾配が好ましい。

上記の操作の順は特に問わず、また、各操作は 2 回又はそれ以上繰り返してもよい。また、それぞれのカラムに試料液を通液する前に、透析等によって試料液を適当な緩衝液に交換しておくことが望ましい。さらに、それぞれの段階で試料液を濃縮してもよい。

精製の各段階においては、分画されたフラクション中に含まれるラフィノース合成酵素活性を測定し、活性の高いフラクションを集めて次の段階に供試することが好ましい。ラフィノース合成酵素活性を測定する方法としては、例えば、Lehle, H らにより報告されている放射性同位体を用いる方法 (Eur. J. Biochem., 38, 103-110 (1973)) が挙げられる。また、この変法として、反応温度と基質濃度を 変更してもよい。例えば、最終濃度として、10 mM ^{14}C -スクロース、20 mM ガラクチノール、25 mM HEPES (2-(4-(2-ヒドロキシethyl)-1-ピペラジニル)エタンスルホン酸) - NaOH, pH 7.0、5 mM DTT (ジチオスレイトール) を含む反応液に、10 μl の酵素液を加えて 50 μl とする。これを、32 $^{\circ}\text{C}$ 、

1時間インキュベートして反応を行い、200 μ lのエタノールを加え、95℃で30秒間加熱して、反応を停止する。この反応液の遠心上清をワットマン3MM濾紙にスポットし、n-プロパノール：酢酸エチル：水=4：1：2にて展開した。¹⁴Cのラフィノースへの取り込みを調べ、これをラフィノース合成酵素活性(nmol/時間)とする。

本発明者は、上記の方法に代わる方法として、ラフィノース合成反応により生成するラフィノースをHPLC(高速液体クロマトグラフィー)により定量することによって、ラフィノース合成酵素活性を測定する方法を開発した。この方法によれば、Lehle, Hらの方法に比べて簡便かつ迅速に測定することができ、特に精製操作における活性フラクションの検出には好適である。以下に本方法を説明する。

ラフィノース合成反応は、最終濃度が下記の組成になるように調製した反応液に10～50 μ lのラフィノース合成酵素液を添加して100 μ lとし、32℃で60分間、反応を行う。

(反応液組成(最終濃度))

- 2.5 mM スクロース
- 5 mM ガラクチノール
- 5 mM DTT
- 20 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.0)

上記のようにして反応を行った後、反応液の4倍容のエタノールを加え、95℃で30秒間加熱して反応を停止する。これを遠心し、遠心上清を減圧乾固した後、蒸留水に溶解し、HPLCにて反応生成物中のラフィノースを定量し、ラフィノース酵素活性とする。HPLCは、例えば、糖分析システムDX500(CarboPac PAIカラム、パルスドアンペロメトリー検出器(ダイオネクス社製))を用いて行うことができる。

反応時間を変化させたときの生成ラフィノース量を上記の方法により測定した結果を図1に示す。図から明らかなように、本方法により、ラフィノース合成酵素活性を直線性よく、かつ簡便に測定することができる。

精製されたラフィノース合成酵素の精製度の確認や分子量の測定は、ゲル電気泳動、ゲルろ過クロマトグラフィー等によって行うことができる。また、酵素学的性質は、反応温度あるいは反応pHを変化させて酵素活性を測定し、あるいは種々の酵素阻害剤や金属イオン等を反応液に添加し、残存酵素活性を測定することによって、検討すればよい。さらに、ラフィノース合成酵素を種々のpH条件下又は温度条件下に一定時間さらした後に酵素活性を測定することにより、安定pH範囲及び安定温度範囲を調べることができる。

前記したラフィノース合成酵素の性質は、このようにして決定されたものであるが、測定条件によって異なる結果が得られる場合があることに留意すべきである。例えば、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量の測定は、用いるゲルろ過剤や緩衝液の種類、あるいは分子量マーカーによって、影響される。また、酵素活性は、同じpHであっても緩衝液の種類又は塩濃度によって異なることが多い。したがって、ラフィノース合成酵素の同定に際しては、個々の性質のみではなく、総合的な検討を行うことが好ましい。

本発明のラフィノース合成酵素は、上記のようにキュウリから単離・精製することによって得られるが、異種タンパク質の醗酵生産に通常用いられている方法によって、後述す

るラフィノース合成酵素をコードするDNAを適当な宿主に導入し、発現させることによって製造することができる。

ラフィノース合成酵素遺伝子を発現させるための宿主としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) をはじめとする種々の原核細胞、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) をはじめとする種々の真核細胞が考えられるが、植物細胞、特にタバコ、キュウリ、シロイヌナズナ (*アラビドプシス*) 等の植物由来の細胞が望ましい。

形質転換に用いる組み換えプラスミドは、発現させようとする細胞の種類に応じた発現ベクターに、ラフィノース合成酵素をコードするDNAを挿入することで調製可能である。植物の発現ベクターは、植物で働くプロモーターDNA配列、またはそれらを複数個組み合わせたものと、植物で働くターミネーターDNA配列を持ち、その両側に外来遺伝子を挿入できる配列を有するものであればよい。

このようなプロモーターには、植物体全体で発現するCaMV 35S RNAプロモーター、CaMV 19S RNAプロモーター、ノバリン合成酵素プロモーター等、緑色組織で発現するRubisCO小サブユニットプロモーター等、種子などの部位特異的に発現するナピン (*napin*)、ファセオリン (*phaseolin*) 等の遺伝子のプロモーター等が挙げられる。さらに、上記のようなターミネーターとしてはノバリン合成酵素ターミネーター、RubisCO小サブユニット3'側部位等が挙げられる。

植物用の発現ベクターとしてpBI121、p35S-GFP (CLONTECH社製) 等が市販されているのでこれを用いてもよい。ウイルスRNAを発現するベクターを用い、そのコードしている外皮蛋白質などの遺伝子をラフィノース合成酵素遺伝子に置換してもよい。

形質転換には通常用いられている方法、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、エレクトロポレーション法、PEG法等を、供試する宿主細胞に応じて用いればよい。ラフィノース合成酵素活性の検出には、ラフィノース合成酵素精製を行った方法を用いることができる。その際、試料を陰イオン交換カラムに通すなどして、あらかじめ α -ガラクトシダーゼを除いておくことが望ましい。

キュウリ由来のラフィノース合成酵素をコードする遺伝子とは、発現した時にラフィノース合成酵素活性を有するものであればすべて含まれるが、好ましくは、配列表の配列番号5記載のアミノ酸配列をコードするDNAを有する遺伝子、又は配列表の配列番号4記載の塩基配列を有する遺伝子が挙げられる。尚、配列表の配列番号5記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子とは、コドンの縮重を考慮すると種々の塩基配列が包含される。即ち、このような種々の塩基配列の中から、遺伝子発現系の諸要素、たとえば宿主細胞の種類等による優先コドン、転写されたRNAにより形成される高次構造の回避などを考慮して選択すればよい。選択された塩基配列は、自然界からクローニングされたDNAであっても、人為的に化学合成されたDNAであってもよい。

< 2 > 本発明のラフィノース合成酵素をコードするDNA

ラフィノース合成酵素をコードするDNAは、キュウリなどの植物体から単離したpoly (A)⁺ RNAからcDNAライブラリーを調製し、このcDNAライブラリーをハイ

ブリダイゼーションによってスクリーニングすることによって、取得することができる。ハイブリダイゼーションに用いるプローブは、ラフィノース合成酵素タンパク質の部分アミノ酸配列に基づいて合成されたオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCR (polymerase chain reaction) によって増幅することによって、取得することができる。

以下に、キュウリ由来のpoly (A)⁺RNAから本発明のDNAを取得する方法を具体的に説明する。

poly (A)⁺RNAの抽出部位としては、ラフィノース合成酵素遺伝子が発現していればキュウリ植物体のどこを用いても良く、様々な生長段階の葉、茎、蕾、果実、種子等より得ることができるが、望ましくは果実をつけた後の展開葉、特に葉脈部分を材料とするのがよい。

キュウリ組織から全RNAを抽出するには、効率よく損傷の少ないRNAが得られるならば方法は制限されず、例えば、フェノール/SDS法、グアニジンイソチオシアネート/塩化セシウム法等、公知のいずれの方法によっても可能である。こうして得た全RNAからオリゴ(dT)担体を用いてpoly (A)⁺RNAを分離できる。また、全RNAを抽出せずにpoly (A)⁺RNAを得ることのできるキット(MPG Direct mRNA Purification Kit、CPG, INC. 社等)を使用しても良い。

cDNAライブラリーのスクリーニングに使用するプローブのDNA断片は、PCRを行うことで得ることができる。既にわかっているペプチド断片のアミノ酸配列、例えば配列表配列番号1~3に示すアミノ酸配列より推定される塩基配列を有する一本鎖DNAを化学合成し、これをプライマーに用いてPCRを行う。プライマーには、得られているペプチド断片のアミノ酸配列のどの部分を用いてもよいが、コドンの縮重が少なく、複雑な高次構造を形成しないと思われる配列を選ぶのが望ましい。また、RACE (Rapid Amplification of cDNA End: PCR PROTOCOLS A Guide to Methods and Applications、ACADEMIC press INC. p28~38)を行っても良い。

このようなPCRの鑄型には、cDNAライブラリー、一本鎖cDNAを用いることが望ましい。PCR反応に逆転写酵素活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼを用いる場合には、poly (A)⁺RNA、場合によっては全RNAを用いても良い。

cDNAライブラリーを作製するためには、まずpoly (A)⁺RNAを鑄型にし、オリゴ(dT)プライマー、ランダムプライマー等を用い、逆転写酵素によって一本鎖cDNAを合成し、次にグブラー-ホフマン (Gubler and Hoffman) 法、オカヤマ-バーグ (Okayama-Berg) 法 (Molecular Cloning 2nd edition、Cold Spring Harbor press、1989) 等により二本鎖cDNAを合成する。ラフィノース合成酵素遺伝子の発現量が少ない場合には、PCRを利用したcDNAライブラリー作製キット (Capfinder PCR cDNA Library Construction Kit (CLONTECH社) 等)を用いて、PCRによってcDNAを増幅してもよい。このようにして合成したcDNAは、平滑末端化、リンカーの付加、PCRによる制限酵素サイトの付加等を行うことにより、ファージベクター、プラスミド等のクローニングベクターにクローニングできる。

ハイブリダイゼンション用のプローブには、上記のPCRで得られたDNA断片のうち、ラフィノース合成酵素cDNAに特徴的な部分を選ぶ。また、5'末端側に近いDNA断片を選ぶのが望ましい。このように選んだ増幅DNA断片を、PCR反応液から精製する。この際、増幅したDNA断片をプラスミドを用いてサブクローニングし、プラスミドを大量調製してから制限酵素で切断し、電気泳動後にゲルを切り出して精製しても、また、プラスミドを鋳型にPCRを行って、目的部分だけを増幅して用いてもよい。さらには、最初に増幅したDNA断片の量が十分に多い場合には、増幅したDNA断片をサブクローニングせずに電気泳動し、目的DNA断片のバンドを含むゲル断片を切り出し、そのゲル断片から精製してもよい。

cDNAライブラリーから目的クローンを得るためのスクリーニングにはハイブリダイゼーションを行う。上記の方法で得られたDNA断片はラベルしてハイブリダイゼーションのプローブとすることができる。ラベルにはラジオアイソトープ、ビオチン等、種々のものを用いることができるが、ランダムプライミング法でラベルすることが望ましい。また、スクリーニングにはハイブリダイゼーションではなくPCRを用いてもよい。さらに、ハイブリダイゼーションとPCRを組み合わせてもよい。

上記のようにして得られたキュウリ由来のラフィノース合成酵素をコードするDNAの塩基配列、及びこの塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列表配列番号4に例示する。また、このアミノ酸配列のみを配列番号5に示す。後記実施例3で得られたラフィノース合成酵素をコードするDNAを含むDNA断片を含むプラスミドpMosslorCRSを保持するエシェリヒア・コリJM109の形質転換体AJ13263は、平成8年11月19日より、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）にブダペスト条約に基づき国際寄託されており、受託番号FERM BP-5748が付与されている。

本発明のDNAは、コードされるラフィノース合成酵素の活性、すなわちスクロースとガラクトノールからラフィノースを生成する活性が損なわれない限り、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むラフィノース合成酵素タンパク質をコードするものであってもよい。ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なる。それは、イソロイシンとバリンのように、アミノ酸によっては、類縁性の高いアミノ酸が存在し、そのようなアミノ酸の違いが、蛋白質の立体構造に大きな影響を与えないことに由来する。従って、キュウリ由来ラフィノース合成酵素を構成する784アミノ酸残基全体に対し、35から40%以上の相同性を有し、ラフィノース合成酵素活性を有するものであってもよい。さらに、好ましくは、510番目のアミノ酸から610番目のアミノ酸の間において、65%の相同性を有することである。さらに好ましくは、「数個」が、2から40個、好ましくは、2から20個、さらに、2から10個である。

遺伝子全長において、約50%以上の相同性があり、かつ、その中で約300塩基にわたる65%以上の相同性がある遺伝子を含む。そのような遺伝子は、GenBankなどのデータベースを用いて、キュウリ由来ラフィノース合成酵素遺伝子に対し相同性を有する遺伝子を検索することによって、塩基配列情報を得ることができる。ホモロジー解析プログラムはLipman-Perelson法を採用したGENETIX-MAC（遺伝子情

報処理ソフトウェア、ソフトウェア開発社)などを用いてもよく、また、インターネット上に公開されているものを使用してもよい。このような方法により得られた塩基配列は遺伝子全長を含む場合と、遺伝子全長を含まない場合がある。遺伝子全長を含まない場合は、目的植物組織より抽出したRNAを鋳型に、キュウリ由来ラフィノース合成酵素遺伝子と相同性の高い部位に対応するプライマーを用い、5' RACE法、3' RACE法にて、容易に全長遺伝子を取得することができる。得られた全長遺伝子は、Soluble Protein Expression System(INVITROGEN社)や、Tight Control Expression System (INVITROGEN社)や、QIAexpress System(QIAGEN社)などのキットが提供する適当な発現ベクターに組み込み、遺伝子を発現させ、記載の方法でラフィノース合成酵素活性を測定し、活性を有するクローンを選抜すればよい。

このようなラフィノース合成酵素と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸が置換、欠失、挿入、付加されるように塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている突然変異処理によっても取得され得る。突然変異処理としては、ラフィノース合成酵素をコードするDNAをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及びラフィノース合成酵素をコードするDNAを保持するエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくは亜硝酸等の通常人工突然変異に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等には、キュウリの個体差、品種間差、遺伝子の多コピー化、各器官、組織の違いに基づく場合などの天然に生じる変異も含まれる。

上記のような変異を有するDNAを、適当な細胞で発現させ、発現産物のラフィノース合成酵素活性を調べることにより、ラフィノース合成酵素と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。また、変異を有するラフィノース合成酵素をコードするDNAまたはこれを保持する細胞から、例えば配列表の配列番号4に記載の塩基配列のうち、塩基番号56~2407からなる塩基配列を有するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ラフィノース合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、ラフィノース合成酵素タンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。ここでいう「ストリンジントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。このような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれるが、それらについては、市販の活性発現ベクターにつなぎラフィノース合成酵素活性を記述の方法で測定することによって容易に取り除くことができる。

尚、本発明のDNAを、ラフィノース合成酵素のアンチセンスRNAを発現させるため

に用いる場合には、このDNAは活性のあるラフィノース合成酵素をコードしている必要はない。また、センスRNAによっても、相同性のある内在性遺伝子の機能を抑制することができる。このような場合も、DNAが活性あるラフィノース合成酵素遺伝子をコードしている必要はなく、また、全長を含まなくてもよく、好ましくは、60%の相同性を有するN末端側翻訳領域が500塩基対程度あればよい。

本発明者らが目的とする、キュウリ由来のラフィノース合成酵素のcDNAのクローニングに成功した方法は上述の通りであるが、それ以外に下記の方法が挙げられる。

(1) キュウリ由来のラフィノース合成酵素を単離精製し、決定されるアミノ酸配列、または配列番号5に示すアミノ酸配列を基に全塩基配列を化学合成する。

(2) キュウリ植物体から染色体DNAを調製し、プラスミドベクター等を用いて染色体DNAライブラリーを作製し、このライブラリーからラフィノース合成酵素遺伝子を、ハイブリダイゼーション又はPCRによって取得する。尚、染色体由来のラフィノース合成酵素遺伝子は、コード領域にイントロンが含まれることが予想されるが、このようなイントロンによって分断されたDNAであっても、ラフィノース合成酵素をコードする限り本発明のDNAに含まれる。

(3) poly(A)⁺RNAを分子量等によって分画し、ホイトジャーム又はウサギ網状赤血球を用いたインビトロ翻訳系に供し、ラフィノース合成酵素活性を有するポリペプチドをコードするmRNAが存在する画分を決定し、それより目的のcDNA断片を作製、取得する。

(4) 抗キュウリラフィノース合成酵素抗体を作製し、蛋白質発現ベクターにcDNAライブラリーを乗せ、適当な宿主に感染させてcDNAがコードする蛋白質を発現させ、先程の抗体を用いて目的のcDNAをスクリーニングしても良い。

(5) ペプチド断片のアミノ酸配列から適当なプライマーを合成し、RACE法によって、末端を含む配列を増幅し、これをクローニングしてもよい。

< 3 > 本発明のラフィノースの製造法

本発明のラフィノースの製造法においては、スクロース及びガラクトノールに上記ラフィノース合成酵素を作用させてラフィノースを生成させる。ラフィノース合成酵素は、スクロースとガラクトノールに作用させると、ガラクトノールを構成するガラクトース残基がスクロースに転移し、ラフィノースが生成する。その際、ガラクトノールを構成するミオイノシトールが生成する。

ラフィノースの製造に使用するラフィノース合成酵素は、植物体から抽出した酵素であっても、本発明のDNAを用いた遺伝子組換え法によって製造した酵素であってもよい。

スクロース及びガラクトノールにラフィノース合成酵素を作用させるには、ラフィノース合成酵素又はラフィノース合成酵素生産能を有する細胞をアルギン酸ゲルやポリアクリルアミドゲル等の担体に固定化した固定化酵素又は固定化細胞をカラムに充填し、このカラムにスクロース及びガラクトノールを含む溶液を通液してもよい。担体及びラフィノース合成酵素又は細胞を担体に固定化する方法は、通常のバイオリアクターに用いられる材

料及び方法を採用することができる。

ラフィノース合成反応は、例えば、スクロース及びガラクトノールを含む水溶液又は緩衝液等の溶液に、ラフィノース合成酵素を添加することによって行われる。前記溶液のpHは、約6～8の範囲内、特にpH7前後に調整されることが好ましい。また、反応温度は約28～42℃、好ましくは35～40℃の範囲内、特に38℃前後であることが好ましい。尚、本発明のラフィノース合成酵素は、約pH5～8の範囲、特にpH6付近で安定である。また、本酵素は少なくとも約40℃以下の温度範囲で安定である。

本発明のラフィノース合成酵素は、ヨードアセトアミド、N-エチルマレイミド、 $MnCl_2$ 、 $ZnCl_2$ 、 $NiCl_2$ によって酵素活性が阻害されるので、これらの物質が反応液に含まれないことが望ましい。

反応液に加えるガラクトノール及びスクロースの濃度は、ガラクトノール 5 mM以上、スクロース 1.5 mM以上が好適である。また、反応液に加えるラフィノース合成酵素の添加量は、基質量に応じて添加すればよい。

反応液に含まれる未反応のスクロース、ガラクトノール及び酵素反応により生じるミオイノシトールからラフィノースを分離する方法としては、例えばゲル濾過クロマトグラフィーが挙げられる。

<4>本発明のキメラ遺伝子及び形質転換植物

本発明のキメラ遺伝子は、ラフィノース合成酵素遺伝子又はその一部と、植物細胞で発現可能な転写制御領域とを含む。ラフィノース合成酵素遺伝子としては、前記<2>に記載した本発明のラフィノース合成酵素をコードするDNAが挙げられる。さらに、本発明のキメラ遺伝子をアンチセンス遺伝子として利用する場合には、ラフィノース合成酵素をコードするDNAの他に、ラフィノース合成酵素遺伝子の非翻訳領域又はその一部であっても、使用できる場合がある。非翻訳領域としては、例えば配列表配列番号4において塩基番号1～55（5'非翻訳領域）、あるいは2407～2517に示す配列（3'非翻訳領域）が挙げられる。

本発明のキメラ遺伝子において、転写制御領域が、ラフィノース合成酵素をコードするDNAに、このDNAコード鎖に相同なmRNA（センスRNA）を発現するように連結されている場合は、このキメラ遺伝子が導入された植物細胞はラフィノース合成酵素を発現し、ラフィノース族オリゴ糖含量が増加する。一方、前記転写制御領域が、前記DNAのコード鎖に相補的な配列を有するRNA（アンチセンスRNA）を発現するように前記DNAに連結されている場合、および、ラフィノース合成酵素遺伝子の一部の断片、好ましくは、上流コード領域の約200塩基対以上に対するセンスRNAを発現するように連結されている場合、これらのキメラ遺伝子が導入された植物細胞は、内在性ラフィノース合成酵素の発現が抑制され、ラフィノース族オリゴ糖が低減化する。

上記のように、本発明のキメラ遺伝子で植物を形質転換し、この遺伝子を植物細胞内で発現させることにより、前記植物のラフィノース族オリゴ糖含量を変化させることができる。

本発明を適用する植物としては、油糧植物であるダイズ、ナタネ、ワタ、砂糖を生産するテンサイ、サトウキビ、モデル植物としてシロイヌナズナ等が挙げられる。

また、植物細胞で発現可能な転写制御領域としては、前述したような、植物全体で発現するCaMV 35SRNAプロモーター、CaMV 19SRNAプロモーター、ノパリン合成酵素プロモーター等、緑色組織で発現するRubisCO小サブユニットプロモーター等、種子などの部位特異的に発現するナピン(napin)、ファセオリン(phaseolin)等の遺伝子のプロモーター領域等が挙げられる。また、キメラ遺伝子の3'末端には、ノパリン合成酵素ターミネーター、RubisCO小サブユニット3'側部位等のターミネーターが連結されてもよい。

キメラ遺伝子で植物を形質転換には通常用いられている方法、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、エレクトロポレーション法、PEG法等を、供試する宿主細胞に応じて用いればよい。

植物にキメラ遺伝子を導入する形質転換法としては、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、エレクトロポレーション法、PEG法等が挙げられる。

アグロバクテリウム法として具体的には、バイナリーベクターを用いる方法がある。すなわち、Tiプラスミド由来のT-DNA、大腸菌などの微生物で機能可能な複製起点、及びベクターを保持する植物細胞または微生物細胞を選択するためのマーカー遺伝子を含むベクターを植物に感染させ、この植物から採取した種子を生育させ、マーカー遺伝子の発現を指標としてベクターが導入された植物を選択する。得られた植物について、ラフィノース合成酵素活性を測定するか、あるいはラフィノース族オリゴ糖の含量が変化したものを選択することによって、目的とする形質転換植物を取得することができる。

以下に、ダイズにキメラ遺伝子を導入する方法について説明する。ダイズ形質転換には、パーティクルガン法(Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 145 (1989)、TIBTECH, 8, 145 (1990)、Bio/Technology, 6, 923 (1988)、Plant Physiol., 87, 671 (1988)、Develop. Genetics, 11, 289 (1990)、Plant cell Tissue & Organ Culture, 33, 227 (1993))、アグロバクテリウム法(Plant Physiol., 91, 1212 (1989)、W094/02620、Plant Mol. Biol., 9, 135 (1987)、Bio/Technology, 6, 915 (1988))、エレクトロポレーション法(Plant Physiol., 99, 81 (1992)、Plant Physiol., 84, 856 (1989)、Plant Cell Reports, 10, 97 (1991))のいずれの方法も用いることができる。

パーティクルガン法においては、エンビオジェニック(embyogenc)組織、あるいは、開やく後30日から40日の未熟種子の胚軸を用いればよい。約1gのエンビオジェニック組織をペトリ皿に広げ、目的のキメラ遺伝子をコーティングした金粒子、タンゲステン粒子などを打ち込めばよい。組織は、1時間から2時間後液体培地に移し、培養する。2週間後、形質転換体選抜のための抗生物質入りの培地に移し、培養する。6週間後に、緑色の耐性不定胚が得られるので、これをさらに新しい培地に移して培養し、植物体を再生させる。あるいは、胚軸を用いた場合には、胚軸を無菌的に摘出し、パーティクルガンで処理した後、高濃度のサイトカイニンを含むMS培地(Murashige and Skoog, Physiologia Plantum, 15, 473-497 (1962))にて培養をする。暗黒下で、2週間培養した後、サイトカイニンの含量を低下させたMS培地にて12時間から16時間、光照射下で室温で培養する。このとき、選抜マーカーとして用いた抗生物質を培地に添加しておくことが望ましい。移植組織より多芽体が形成したら、ホルモン無添加の培地に移すことで、発根させる。この幼植物体を温室に移し、栽培する。

アグロバクテリウムを用いる方法では、植物組織としてコチルドナリーノッド (Cotyledonary nod) を用いることが望ましい。アグロバクテリウムは、市販の L B A 4 4 0 4、C 5 8、Z 7 0 7 などを用いることができるが、望ましくは、Z 7 0 7 がよい。ベクターは、p M O N 5 3 0 (Monsanto Co.) に目的遺伝子を挿入したプラスミドなどを用いることができる。ダイレクト・フリーズ・ソー (Direct freeze thaw) 方法 (An et al., Plant Mol. Biol. Manual A3:1-19, 1988) などによって、アグロバクテリウム ツメファシエンズ (*Agrobacterium tumefaciens*) Z 7 0 7 (Hepburn et al., J. Gen. Microbiol. 131, 2961 (1985)) にプラスミドを導入する。このキメラ遺伝子で形質転換したアグロバクテリウムは、一晚培養し、5 0 0 0 r p m、5 分間遠心し、B 5 懸濁培地に懸濁する。ダイズ種子は滅菌し 1 / 1 0 濃度の B 5 培地にて 3 日間培養し、発芽させる。子葉を切り出し、アグロバクテリウムの懸濁液で、2 時間供培養する。この子葉を B 5 培地 (ガンボルグ (Gamborg) B 5 塩 (Exp. Cell. Res., 50, 151 (1968)、ガンボルグ B 5 ビタミン、3 % スクロース、5 μ M ベンジルアミノプリン、1 0 μ M I B A、1 0 0 μ M アセトシリンゴン含有) に移し、2 5 $^{\circ}$ C、2 3 時間光照射 (6 0 μ E m $^{-2}$ S $^{-1}$) の条件下で 3 日間培養する。次に、アグロバクテリウムを除去するために B 5 培地 (5 μ M ベンジルアミノプリン、1 0 0 m g / L カルベニシリン、1 0 0 m g / L バンコマイシン、5 0 0 m g / L セファタキシム (cefotaxime)) にて 4 日間 2 5 $^{\circ}$ C で毎日培地を交換しながら培養する。その後、B 5 培地 (2 0 0 m g / L カナマイシン) にて培養する。1 から 2 カ月でマルチシュートが形成される。これを、B 5 培地 (0. 5 8 m g / L ジベレリン、5 0 m g / L カナマイシン) で培養し、シュートを伸長させる。次に、B 5 培地 (1 0 μ M I B A) に移し、発根させる。発根した幼植物体は、馴化し、温室にて栽培することによって形質転換体を得ることができる。

ラフィノース合成酵素遺伝子を導入した形質転換体植物の確認は、形質転換体より、D N A を抽出し、ラフィノース合成酵素遺伝子をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションを行えば容易に確認できる。

図面の簡単な説明

図 1 は、ラフィノース合成反応によって生じるラフィノース生成量と反応時間との関係を示す図。

図 2 は、ラフィノース合成酵素の S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す写真。M は分子量マーカーを、S はラフィノース合成酵素を含む試料を示す。数字は分子量 (k D a) を表す。

図 3 は、ラフィノース合成酵素活性に対する反応温度の影響を示す図。

図 4 は、ラフィノース合成酵素活性に対する反応 p H の影響を示す図。

図 5 は、ラフィノース合成酵素活性に対するミオイノシトールの影響を示す図。

図 6 は、ラフィノース合成酵素の安定 p H 範囲を示す図。

図 7 は、合成プライマーとペプチドのアミノ酸配列との関係を示す図。R は A 又は G を、Y は C 又は T を、M は A 又は C を、K は G 又は T を、D は G、A 又は T を、H は A、T 又は C を、B は G、T 又は C を、N は G、A、T 若しくは C を、I はイノシンを表す。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

はじめに、以下の実施例において、各精製工程における活性画分の確認及び酵素の特性検討に用いたラフィノース合成酵素活性の測定法を説明する。

<ラフィノース合成酵素活性測定法>

ラフィノース合成酵素の活性は、ラフィノース合成反応により生成したラフィノースをHPLC（高速液体クロマトグラフィー）により定量することによって行った。HPLCは、糖分析システムDX500（CarboPac PA1カラム、パルスドアンペロメトリー検出器（ダイオネクス社製））を用いて行った。

ラフィノース合成反応は、最終濃度が下記の組成になるように調製した反応液に10～50 μ lのラフィノース合成酵素液を添加して100 μ lとし、32℃で60分間、反応を行った。

（反応液組成（最終濃度））

- 2.5 mM スクロース
- 5 mM ガラクチノール
- 5 mM DTT
- 20 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.0）

・上記のようにして反応を行った後、反応液の4倍容のエタノールを加え、95℃で30秒間加熱して反応を停止した。これを遠心し、遠心上清を減圧乾固した後、蒸留水に溶解し、糖分析システムにて反応生成物中のラフィノースを定量し、ラフィノース酵素活性とした。

実施例1 キュウリからのラフィノース合成酵素の精製

<1>キュウリからのラフィノース合成酵素の抽出

播種後6～10週間のキュウリ（品種「SUYOU」）本葉より、葉脈系を集め、液体窒素にて凍結し、-80℃にて保存した。凍結した葉脈系約200gを液体窒素下で乳鉢にて磨砕し、緩衝液1（40mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.0）、5mM DTT、1mM PMSF（フェニルメタンスルフォニルフルオリド）、1%ポリクラールAT；セルバ社製）を加え、蛋白質を抽出した。抽出液は、ガーゼやミラクロス（カルバイオケム・ノボバイオケム（Calbiochem-Novobiochem）社）などのフィルターにて濾過し、濾液を4℃、約30,000 \times gで60分間遠心した。得られた遠心上清を粗抽出液とした。

<2>陰イオン交換クロマトグラフィー（1）

上記で得られた粗抽出液約560mlを、緩衝液2（20mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.0）、5mM DTT）にて平衡化した強塩基性陰イオン交換クロマトグラフィーカラム（HiTrap Q；ファルマシア社製、1.6cm \times 2.5cm）を5本連結したカラムに供し、ラフィノース合成酵素活性をカラムに吸着させた。続いてカラムの5倍容の緩衝液3（20mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.0）、0.2M NaCl、5mM DTT）

にてカラムを洗浄して非吸着蛋白質を洗い流した後、50 mlの緩衝液4 (20 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.0)、0.3 M NaCl、5 mM DTT)にてラフィノース合成酵素活性をカラムから容出させた。

<3>陰イオン交換クロマトグラフィー (2)

上記の溶出液約75 mlを透析チューブ (Pormembranes MWC O:10,000; スペクトラ(Spectra)社製)に入れ、10 Lの緩衝液5 (20 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.0)、0.05 M NaCl、5 mM DTT)に対して、4℃で一晩透析した。透析した試料を緩衝液5で平衡化した弱塩基性陰イオン交換クロマトグラフィーカラム (DEAE-TOYOPEARL; 東ソー社製、2.2×20 cm)に供し、ラフィノース合成酵素活性をカラムに吸着させた。続いてカラムの5倍容の緩衝液5にてカラムを洗浄して非吸着蛋白質を洗い流した後、20カラム容に対し0.05 M~0.35 MのNaCl濃度勾配を直線的にかけて酵素活性を溶出し分画した。

<4>ゲル濾過クロマトグラフィー

上記で得られた溶出液約160 mlを、濃縮器 (セントリプレッ10; Amicon社製)を用いて6.5 mlに濃縮した。この濃縮液3 mlずつをゲル濾過クロマトグラフィーカラム (Superdex 200 pg; ファルマシア社製、2.6 cm×60 cm)に供した。カラムの平衡化と溶出は、緩衝液6 (20 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.0)、0.1 M NaCl、5 mM DTT、0.02% Tween 20)を用いて行った。分画した各画分のうち、ラフィノース合成酵素活性を有する画分を集めた。

<5>ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー

ゲル濾過で分画したラフィノース合成酵素活性画分約25 mlを、セントリプレッ10にて濃縮し、さらに、緩衝液7 (0.01 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)、5 mM DTT、0.02% Tween 20)を用いて緩衝液交換を行った。得られた濃縮液約1.2 mlを、あらかじめ同緩衝液にて平衡化したハイドロキシアパタイトカラム (Bio-Scale CHT-1; バイオラッド社製、0.7×5.2)に供し、ラフィノース合成酵素活性を吸着させた。カラムを、カラム体積の5倍量(10 ml)の同緩衝液にて洗浄した後、20カラム容に対し、0.01 M~0.3 Mのリン酸濃度勾配を直線的にかけて酵素活性を溶出し分画した。

<6>ハイドロキシアパタイトリクロマトグラフィー

上記のようにして得られたハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる活性画分を同様にしてリクロマトし、精製ラフィノース合成酵素画分(約2 ml)とした。

本活性画分の蛋白質量は約200 µgであった。また、全活性は5700 nmol/時間であり、蛋白質当たりの比活性は約28 µmol/時間/mgであった。この活性画分は、後述するように電気泳動上で分子量約90 kDa~100 kDaの単一バンドを示すタンパク質のみを含んでいた。得られた精製酵素標品の比活性は、粗抽出液の約2000倍であり、HiTrap Qによる強塩基性陰イオン交換クロマトグラフィー後の酵素量に対する回収率は12%であった。精製の結果を表1にまとめた。

表 1

	全蛋白質 mg	全活性 nmol/h	比活性 nmol/h/mg	収率 %
粗抽出液	1915	20700	11	—
HiTrapQ	1092	48800	45	100
DEAE-TOYOPERL	540	33000	61	68
Superdex 200pg	1.79	26500	14800	54
ハイト・ロキシアハ°タイトクロマトグラフィー(1)	0.51	12600	24700	26
ハイト・ロキシアハ°タイトクロマトグラフィー(2)	0.20	5700	28500	12

実施例 2 ラフィノース合成酵素の特性の検討

実施例 1 で得られた精製ラフィノース合成酵素の特性を検討した。

< 1 > 分子量測定

(1) ゲルろ過クロマトグラフィー

精製ラフィノース合成酵素を $10 \mu\text{l}$ とり、この試料および分子量マーカー（ゲル濾過用分子量マーカーキット：ファルマシア社製）をゲルろ過クロマトグラフィーカラム（Superdex 200pg；ファルマシア社製）に供した。カラムの平衡化と溶出は、緩衝液 6（ 20 mM トリス塩酸緩衝液（ $\text{pH} 7.0$ ）、 0.1 M NaCl 、 5 mM DTT 、 0.02% Tween 20）を用いて行った。その結果、ラフィノース合成酵素の分子量は、約 $75 \text{ kDa} \sim 95 \text{ kDa}$ と推定された。

(2) ポリアクリルアミドゲル電気泳動（Native PAGE）

精製ラフィノース合成酵素を $10 \mu\text{l}$ とり、同量のサンプル緩衝液（ 0.0625 M トリス塩酸（ $\text{pH} 6.8$ ）、 15% グリセロール、 0.001% BPPB）を加え、電気泳動サンプルとした。このサンプル $10 \mu\text{l}$ を 10% ポリアクリルアミドゲル（第一化学薬品製、マルチゲル 10）に供し、 0.025 M トリス— 0.192 M グリシン緩衝液（ $\text{pH} 8.4$ ）で 40 mA 、約 60 分泳動した。泳動後、シルベストステイン銀染色キット（ナカライテスク社製）にて染色した。その結果、分子量は約 $90 \text{ kDa} \sim 100 \text{ kDa}$ と推定された。

(3) SDS—ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS—PAGE）

精製ラフィノース合成酵素を $10 \mu\text{l}$ とり、同量のサンプル緩衝液（ 0.0625 M トリス塩酸（ $\text{pH} 6.8$ ）、 2% SDS、 10% グリセロール、 5% メルカプトエタノール、 0.001% BPPB）を加え沸騰浴中で 1 分間加熱し、電気泳動サンプルとした。このサンプル $10 \mu\text{l}$ を $10 \sim 20\%$ グラジエントポリアクリルアミドゲル（第一化学薬品製）に供し、 0.1% SDS を含む 0.025 M トリス— 0.192 M グリシン緩衝液（ $\text{pH} 8.4$ ）で 40 mA 、約 70 分泳動した。泳動後、シルベストステイン銀染色キット（ナカライテスク社製）にて染色した。結果を図 2 に示す。その結果、分子量は約 $90 \text{ kDa} \sim 100 \text{ kDa}$ と推定された。

< 2 > 反応至適温度

前記のラフィノース合成酵素活性測定法にしたがって、種々の温度条件下（28℃、32℃、36℃、40℃、44℃、48℃、52℃）でラフィノース合成酵素活性を測定した。各反応液に加えた酵素液は、2 μ l とした。32℃での酵素活性を100としたときの各温度での相対活性を図3に示す。その結果、ラフィノース合成酵素は、約25～42℃にわたる範囲で活性を示し、反応至適温度は、35～40℃付近であった。

< 3 > 至適反応pH

前記のラフィノース合成酵素活性測定法にしたがって、種々のpH条件下（pH4～11）でラフィノース合成酵素活性を測定した。各反応には、50mM クエン酸緩衝液（pH4～6）、50mM リン酸カリウム緩衝液（pH5.5～7.5）、50mM ビスートリス緩衝液（pH6～7）、20mM トリス-塩酸緩衝液（pH7～8.5）、50mM グリシン-NaOH緩衝液（pH9～11）を用いた。また、各反応液に加えた酵素液は、2 μ l とした。結果を図4に示す。

その結果、ラフィノース合成酵素はpH5～10の範囲で活性を示し、反応至適pHは、用いた緩衝液の種類によっても異なるが、6～8付近であった。

< 4 > 阻害剤及び金属イオンの検討

精製ラフィノース合成酵素の反応液に、各種の酵素阻害剤又は金属イオンを終温度で1mMとなるように添加し、ラフィノース合成酵素活性を前記と同様にして測定した。阻害剤又は金属イオンを添加しない場合の酵素活性に対する残存活性を表2に示す。ヨードアセトアミドは酵素活性を顕著に阻害し、N-エチルマレイミドも阻害効果を示した。また、CaCl₂、CuCl₂、MgCl₂は阻害効果がほとんど認められなかったが、MnCl₂、ZnCl₂、NiCl₂は阻害効果を示した。

表2

阻害剤又は金属イオン	残存活性 (%)
無添加	100
ヨードアセトアミド	0
N-エチルマレイミド	40
CaCl ₂	115
CuCl ₂	101
MgCl ₂	96
MnCl ₂	32
ZnCl ₂	42
NiCl ₂	68

< 5 > ミオイノシトールによる阻害

ラフィノース合成反応の反応生成物であるミオイノシトールによる阻害を調べた。各種濃度のミオイノシトールを反応液に添加し、ラフィノース合成酵素活性を測定した。結果を図5に示す。添加したミオイノシトールの濃度とともに酵素活性は阻害された。

< 6 > 安定 pH

50 mM ビストリス塩酸緩衝液 (pH 5~8, 0.5 mM DTTを含む)、又は20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7~8, 0.5 mM DTTを含む) 中で、前記陰イオン交換クロマトグラフィー (2) で得られたラフィノース合成酵素画分を4時間、4℃にてインキュベートした後、ラフィノース合成酵素活性を測定した。インキュベートに用いた緩衝液のpHに対する酵素活性を図6に示す。いずれのインキュベート条件においてもラフィノース合成活性が認められ、特にpH 5~7.5の範囲で安定であった。

< 7 > 安定温度

20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7, 5 mM DTTを含む) にて、前記陰イオン交換クロマトグラフィー (2) で得られたラフィノース合成酵素画分を28℃、32℃、37℃又は40℃で60分インキュベートした後、ラフィノース合成酵素活性を測定した。その結果、本酵素は、28℃~40℃の範囲で前記インキュベート処理を行わなかった対照区と比較して80%~100%の活性を有し、安定であった。

< 8 > アミノ酸配列の解析

精製ラフィノース合成酵素のシステイン残基を還元ピリジリエチル化し、脱塩した。これをリジレンドペプチダーゼ (Achromobacter protease 1、和光純薬工業社製) にて37℃、12時間消化し、ペプチド断片化した。得られたペプチド混合液を逆相HPLC (カラム: ウォーターズ μ Bondasphere (ϕ 2.1 \times 150 mm, C₁₈, 300 Å)、ウォーターズ社製 (ミリポア社)) に供し、各ペプチド断片を分離取得した。溶媒には0.1% TFA (トリフルオロ酢酸) を用い、アセトニトリルの濃度勾配により溶出を行った。取得したペプチド断片のうち、3つの断片について、アミノ酸配列をプロテインシークエンサーにより決定した。決定された各ペプチドのアミノ酸配列を配列表配列番号1~3に示す。以下、これらのペプチドを、それぞれ順にペプチド1、2、及び3という。

実施例3 ラフィノース合成酵素をコードするDNAの取得

< 1 > PCR法によるラフィノース合成酵素cDNAの部分断片の単離

キュウリの主葉脈22gを液体窒素中で乳鉢を用いて磨砕した。この磨砕物を、80℃に加熱した抽出バッファー (100 mM塩化リチウム、100 mMトリス-塩酸 (pH 8.0)、10 mM EDTA、1% SDS) と等量のフェノールを混合したものに加え、攪拌後、フェノールと等量のクロロホルム: イソアミルアルコール (24:1) を加え、再び攪拌を行い、この混合液を4℃で9250 \times g、15分間遠心処理し、上清を採取した。この上清に対して繰り返しフェノール処理、クロロホルム: イソアミルアルコール処理を行い、遠心上清を得た。この上清に等量の4 M塩化リチウムを加え、-70℃で1時間静置した。

室温にて解凍後、4℃で9250 \times g、30分間遠心処理し沈殿を得た。この沈殿を2 M塩化リチウム、80%エタノールにより1回ずつ洗浄し、乾燥後2 mlのジエチルピロカーボネート処理水に溶解し、精製全RNAとした。得られた全RNAは2.38 mgであった。

この全RNA全量を、オリゴ (dT) セルロースカラムを用いたpoly (A)⁺ RNA

精製キット (STRATAGENE CLONING SYSTEMS 社製) に供し、poly (A)⁺RNA 分子を精製し、42.5 μ g の poly (A)⁺RNA を得た。

上記のようにして得られた poly (A)⁺RNA から逆転写酵素 Super Script II (GIBCO BRL 社製) を用いて一本鎖 cDNA を合成した。この cDNA 混合物からラフィノース合成酵素 cDNA を単離するために、PCR 法による増幅を行った。PCR に用いるプライマーは、実施例 2 で決定したキュウリ由来のラフィノース合成酵素のペプチド断片のアミノ酸配列から、図 7 に示す一本鎖オリゴヌクレオチド (配列番号 6 ~ 22) を合成した。各プライマーの配列において、R は A 又は G を、Y は C 又は T を、M は A 又は C を、K は G 又は T を、D は G、A 又は T を、H は A、T 又は C を、B は G、T 又は C を、N は G、A、T 若しくは C、又はイノシン (塩基はヒポキサンチン) を、それぞれ表す。

プライマーとして、5' 側プライマーに A (A1 (配列番号 6)、A2 (配列番号 7)、A3 (配列番号 8)、A4 (配列番号 9))、3' 側プライマーに D' (D'1 (配列番号 21)、D'2 (配列番号 22)) の組み合わせと、5' 側プライマーに C2 (配列番号 14))、及び 3' プライマーに B'1 (配列番号 18)、あるいは B'2 (配列番号 19) を用いたときに、約 540 塩基対の DNA が増幅された。この断片を TA クローニングキット (INVITROGEN BV 社製) を用いてプラスミド pCRII にクローニングし、塩基配列を解析したところ、両末端のプライマー配列の内側にペプチド 1、2 のアミノ酸配列をコードしている塩基配列が存在し、前記増幅断片はラフィノース合成酵素遺伝子に由来する DNA 断片であることがわかった。

さらに、クローニングした上記 PCR 増幅 DNA 断片のラフィノース合成酵素遺伝子上での位置を特定するために、RACE キット (3' Ampifinder RACE Kit (CLONTECH 社製)) を用いて、3' RACE を行った。

前記 cDNA 混合物を鋳型に、5' 側プライマーに C (C1 (配列番号 13)、C2 (配列番号 14))、3' 側プライマーにはオリゴ (dT) とアンカー配列を有するプライマーを用いて PCR を行い、さらにこうして得られた増幅断片を鋳型に、C より内側に位置する D (D1 (配列番号 15)、D2 (配列番号 16)) を 5' 側プライマーに、3' 側プライマーにはオリゴ (dT) - アンカープライマーを用いて PCR を行った。その結果、C1 (配列番号 13)、C2 (配列番号 14) とオリゴ (dT) - アンカープライマーで増幅した DNA を鋳型に、D2 (配列番号 16) とオリゴ (dT) - アンカープライマーで PCR を行ったときのみ、約 2400 塩基対の DNA 断片が増幅した。また、5' 側プライマーに C (C1 (配列番号 13)、C2 (配列番号 14))、3' 側プライマーにはオリゴ (dT) - アンカープライマーを用いて PCR を行い、さらにこうして得られた増幅断片を鋳型に、5' 側プライマーに E (配列番号 17)、3' 側プライマーにはオリゴ (dT) - アンカープライマーを用いて PCR を行った。その結果、いずれの場合も、約 300 塩基対の DNA 断片を増幅した。

同様に、前記 cDNA 混合物を鋳型に、5' 側プライマーに A (A1 (配列番号 6)、A2 (配列番号 7)、A3 (配列番号 8) あるいは A4 (配列番号 9))、3' 側プライマーにはオリゴ (dT) とアンカー配列を有するプライマーを用いて PCR を行い、さらにこうして得られた増幅断片を鋳型に、A より内側に位置する B (B1 (配列番号 10)、B2 (配列

番号11)あるいはB3(配列番号12))、3'側に同じオリゴ(dT)-アンカープライマーを用いてPCRを行った。その結果、Aのいずれのプライマーを用いたときも、B2プライマーを用いたときに約2000塩基対のDNA断片を得た。そこで、A2、B2プライマーを用いて増幅したDNA断片をクローニングした。塩基配列を解析したところ、5'側にプライマー作成に用いたペプチド断片1のアミノ酸配列をコードする塩基配列が存在した。また、3'側にはpoly(A)配列と、その上流にペプチド断片3に対応する塩基配列が存在した。

先のPCRの結果と合わせると、ラフィノース合成酵素ペプチド断片は、そのN末端側から2、1、3の順に並んでおり、先にPCRによって得られた約540塩基対のDNA断片は、ラフィノース合成酵素遺伝子上の5'末端に近い部分であることがわかった。ラフィノース合成遺伝子全長を含むcDNAクローンをスクリーニングするためには、プローブとするDNAが5'末端側に近い部分を検出できることが望ましいため、このDNA断片をプローブとしてcDNAライブラリーのスクリーニングに使用した。

<2>ラフィノース合成酵素cDNAのコード領域全長のクローニング

まず、以下のようにしてcDNAライブラリーを作製した。<1>で得られたpoly(A)⁺RNA 3.8μgからTime Saver cDNA合成キット(Pharmacia Biotech社製)を用いて、2本鎖cDNAを合成した。得られたcDNAを、λファージベクターλMOSSlox(Amersham社製)のEcoRI制限酵素切断部位に組み込んだ後、GigapackII Goldパッケージングキット(STRATAGENE CLONING SYSTEMS社製)を用いて、ファージ蛋白質中に取り込ませ、キュウリのcDNAライブラリーを調製した。なお、本ライブラリーのタイターは 1.46×10^7 pfu/μgベクターであった。

上記のキュウリのcDNAライブラリーから 1.4×10^6 pfuに相当するファージを宿主細胞エシェリヒア・コリ ER1647に感染させた後、直径90mmの寒天プレート14枚に、プレートあたり 1.0×10^4 pfuとなるように蒔いた。これを37℃で約6.5時間培養した後、プレート上に形成されたファージプラークをナイロンメンブレン(Amersham社製Hybond-N+)に転写した。

次に、上記ナイロンメンブレンを、アルカリで処理して転写されたDNAを変性させ、中和した後に洗浄した。その後、このナイロンメンブレンを80℃で2時間処理することでDNAをメンブレン上に固定した。

得られたナイロンメンブレンに対し、<1>で得た約540塩基対のDNA断片をプローブに用い、陽性クローンのスクリーニングを行った。上記の約540塩基対のDNA断片を、制限酵素EcoRIで消化後に電気泳動し、約540塩基対のインサートのみを切り出して精製したものを、DNAラベル・検出システム(Gene Images ラベリング・検出システム(Amersham社製))を用いてフルオレセインラベルし、プローブとした。前記のナイロンメンブレンを60℃で30分間、プレハイブリダイゼーションを行い、次いでラベルしたプローブを加えて60℃で16時間のハイブリダイゼーションを行った。ラベルされたDNAを検出するための抗体(アルカリフォスファターゼ標識抗フルオレセイン抗体)は、50000倍に希釈して用いた。このスクリーニングにおい

て陽性クローンの候補株を得た。得られた候補株について上記と同様にしてスクリーニングをさらに2回繰返し、純化した陽性クローンを取得した。

上記の陽性クローンをエシェリヒア・コリBM25. 8に感染させ、カルベニシリンを含む選択培地上で培養することで、cDNAを含むプラスミドベクターλMOSS10x-CRSを切り出した。このプラスミドの挿入cDNAの長さは約2.5kbであった。さらにこのプラスミドで腸菌JM109を形質転換し、形質転換体からプラスミドDNAを調製し、これを塩基配列を解析するための試料とした。

挿入cDNAの塩基配列の解析にはTaq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer社製)を用いる従来公知の方法で行った。

その結果、配列表の配列番号4に示す2352塩基対よりなる塩基配列が明らかとなった。この配列中には、本発明者らが用いたDNAプローブの塩基配列と一致する部分が存在した。また、塩基配列から翻訳されるアミノ酸配列を配列番号4及び配列番号5に示した。このアミノ酸配列中には、本発明者らが得たキュウリ由来のラフィノースシンターゼのペプチド1 (配列番号5中、アミノ酸番号215~244)、2 (配列番号5中、アミノ酸番号61~79) 及び3 (配列番号5中、アミノ酸番号756~769) と一致する部分が存在し、ラフィノース合成酵素をコードすることが確認された。

上記のようにして得られたラフィノース合成酵素をコードするDNAを含むプラスミドpMoss10xCRSを保持するエシェリヒア・コリJM109の形質転換体AJ13263は、平成8年11月19日より、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号) にブダペスト条約に基づき国際寄託されており、受託番号FERM BP-5748が付与されている。

実施例4 ラフィノース合成酵素をコードするDNAを含む キメラ遺伝子及び形質転換植物

<1>キメラ遺伝子を含むプラスミドの構築

アグロバクテリウムとしてLBA4404、バイナリーベクターとしてpBI121 (CLONTECH社)を用いて、シロイヌナズナにラフィノース合成酵素のDNA断片を導入した。pBI121は、pBIN19由来のプラスミドであり、ノパリン合成酵素遺伝子プロモーター、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ構造遺伝子(NPTII)、ノパリン合成酵素遺伝子ターミネーター(Nos-ter)、CaMV 35Sプロモーター、GUS (β -グルクロニダーゼ) 遺伝子、及びNos-terが接続し、これらの両側に植物への移行が可能な配列を有する。CaMV 35Sプロモーターの下流にはSma I部位があり、この部位に挿入されたインサートは該プロモーターの制御下で発現する。

バイナリーベクターpBI121に、実施例3で得られたラフィノース合成酵素遺伝子断片を挿入した。ラフィノース合成酵素遺伝子をDra I消化し、配列表配列番号4において30番目から1342番目までの塩基を含むDNA断片をアガロースゲル電気泳動により調製した。この断片をpBI121のSma Iサイトにライゲーションした。このライゲーション反応液を用いてエシェリヒア・コリHB101を形質転換し、形質転換株から組換えプラスミドを調製した。得られた組換えプラスミドのうち、CaMV 35Sプロ

モーターにラフィノース合成酵素DNA断片が逆向きに接続したもの（アンチセンス）、正の向きに接続したもの（センス）ものを2種選択し、それぞれ、pBIRS1及びpBIRS9と命名した。

上記のようにして得られたプラスミドを、トリペアレンタルメイティングによりアグロバクテリウムLBA4404に導入した。

シロイヌナズナの形質転換は以下のように行った。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の種子は、吸水処理後、1% Tween 20を含む80%エタノールにて5分間、同じく1% Tween 20を含む10%次亜塩素酸ナトリウムで10分間処理し、滅菌水で5回洗浄して殺菌した。これを、1%低融点アガロースに懸濁し、MS培地 (MS基本培地 (Murashige and Skoog, *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497 (1962))、B5ビタミン、10 g/L スクロース 0.5 g/L MES、pH 5.8) にまいた。これを、22℃、16時間光照射、8時間暗期の培養室にて1週間培養し、双葉が展開したものをロックウールに定植した。同条件で培養を続け、約3週間後、植物が抽台し、莖の高さが数cmになったところで摘心をした。摘心後1週間し、伸長した側枝の最初の花が開花した状態まで生育させた。

ラフィノース合成酵素遺伝子を含む組換えプラスミドを導入したアグロバクテリウムの前培養を2 mlのLB培地で行った。これを、50 mg/L カナマイシン、25 mg/L ストレプトマイシン含有のLB培地に接種し28℃で、約1日培養した。室温で集菌し、浸潤用懸濁培地 (1/2 MS塩、1/2 ガンボルグ (Gamborg) B5 ビタミン、5% スクロース、0.5 g/L MES、pH 5.7 (KOH)、使用直前にベンジルアミノプリンを最終濃度0.044 μ M、またシルウェット (Silwet L77) を1 L当たり200 μ l (最終濃度0.02%) 加える) に菌液のOD₆₀₀が0.8になるように懸濁した。

浸潤を行う植物より開花結実している花を取り除いた。ロックウールを逆さにして、前記アグロバクテリウム懸濁液に結実していない花を漬け、デシケータに入れて、40 mm HGで15分間減圧した。2から4週間で、種子を集めた。収穫した種子は、デシケータで保存した。

つぎに、選抜培地にて、形質転換体を選抜した。先に述べたように種子を殺菌し、選抜培地 (MS塩、ガンボルグB5 ビタミン、1% スクロース、0.5 g/L MES、pH 5.8、0.8% 寒天；オートクレーブ後、選択用抗生物質、カルベニシリン (最終濃度100 mg/L、カナマイシン (最終濃度50 mg/L) を加える) にて22℃で培養し、耐性植物を選抜した。耐性植物は新しい培地に移し、本葉が展開するまで育てた。この植物から種子を収穫した。同様の選抜を繰り返し、T3種子を獲得した。T3種子について、先に述べた方法によりラフィノース含量を定量した。結果を表4に示す。

表 4

植 物	ラフィノース含量 (mg/g)
野生株	0.2
形質転換体 (pBIRS1)	0.0
形質転換体 (pBIRS9)	0.0

産業上の利用可能性

本発明により、精製されたラフィノース合成酵素、ラフィノース合成酵素遺伝子、ラフィノース合成酵素遺伝子と植物で発現可能な制御領域を有するキメラ遺伝子、及びこのキメラ遺伝子が導入された植物が提供される。

本発明のラフィノース合成酵素を用いることにより、スクロース及びガラクトノールから効率よくラフィノースを合成することができる。また、本発明のラフィノース合成酵素遺伝子又はキメラ遺伝子を利用することにより、植物のラフィノース族オリゴ糖含量を変化させることができる。

配列表

(1) 一般情報

- (i) 出願人：味の素株式会社
- (ii) 発明の名称：ラフィノース合成酵素遺伝子、ラフィノースの製造法
及び形質転換植物
- (iii) 配列数：22
- (v) コンピュータ読取り可能形式
 - (A) 媒体：フロッピーディスク
 - (B) コンピュータ：IBM PC 互換
 - (C) 操作システム：PC-DOS/MS-DOS
 - (D) ソフトウェア：PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) 配列番号1の配列の情報：

- (i) 配列の性質：
 - (A) 配列の長さ：30 amino acids
 - (B) 配列の型：アミノ酸
 - (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (v) フラグメント型：internal
- (xi) 配列：SEQ ID NO:1:

Phe	Gly	Trp	Cys	Thr	Trp	Asp	Ala	Phe	Tyr	Leu	Thr	Val	His	Pro	Gln
1				5				10					15		
Gly	Val	Ile	Glu	Gly	Val	Arg	His	Leu	Val	Asp	Gly	Gly	Cys		
			20					25					30		

(2) 配列番号1の配列の情報：

- (i) 配列の性質：
 - (A) 配列の長さ：19 amino acids
 - (B) 配列の型：アミノ酸
 - (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (v) フラグメント型：internal
- (xi) 配列：SEQ ID NO:2:

Pro	Val	Ser	Val	Gly	Cys	Phe	Val	Gly	Phe	Asp	Ala	Ser	Glu	Pro	Asp
1				5				10					15		
Ser	Arg	His													

(2) 配列番号3の配列の情報：

- (i) 配列の性質：
 - (A) 配列の長さ：14 amino acids

- (B) 配列の型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: ペプチド
- (v) フラグメント型: internal
- (xi) 配列: SEQ ID NO:3:

Tyr Asp Gln Asp Gln Met Val Val Val Gln Val Pro Trp Pro
1 5 10

(2) 配列番号4の配列の情報:

- (i) 配列の性質:
 - (A) 配列の長さ: 2517 base pairs
 - (B) 配列の型: 核酸
 - (C) 鎖の数: 2本鎖
 - (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: cDNA to mRNA
- (vi) 起源:
 - (A) キュウリ (Cucumis sativas)
 - (B)
- (ix) 配列の特徴:
 - (A) 特徴を表す記号: CDS
 - (B) 存在位置: 56..2407

(xi) 配列: SEQ ID NO:4:

```
AAAAAACAAC CCTTCTTTTA GTTTTTGGG TTTGTTTCTT CTTTCTTCT CACAA ATG      58
                                         Met
                                         1
GCT CCT AGT TTT AAA AAT GGT GGC TCC AAC GTA GTT TCA TTT GAT GGC      106
Ala Pro Ser Phe Lys Asn Gly Gly Ser Asn Val Val Ser Phe Asp Gly
          5          10          15
TTA AAT GAC ATG TCG TCA CCG TTT GCA ATC GAC GGA TCG GAT TTC ACT      154
Leu Asn Asp Met Ser Ser Pro Phe Ala Ile Asp Gly Ser Asp Phe Thr
          20          25          30
GTG AAC GGT CAT TCG TTT CTG TCC GAT GTT CCT GAG AAC ATT GTT GCT      202
Val Asn Gly His Ser Phe Leu Ser Asp Val Pro Glu Asn Ile Val Ala
          35          40          45
TCT CCT TCT CCG TAC ACT TCG ATA GAC AAG TCC CCG GTT TCG GTT GGT      250
Ser Pro Ser Pro Tyr Thr Ser Ile Asp Lys Ser Pro Val Ser Val Gly
          50          55          60          65
TGC TTT GTT GGA TTC GAC GCG TCG GAA CCT GAT AGC CGA CAT GTT GTT      298
Cys Phe Val Gly Phe Asp Ala Ser Glu Pro Asp Ser Arg His Val Val
          70          75          80
```

TCG ATT GGG AAG CTG AAG GAT ATT CCG TTT ATG AGT ATT TTC AGG TTT	346
Ser Ile Gly Lys Leu Lys Asp Ile Arg Phe Met Ser Ile Phe Arg Phe	
85 90 95	
AAG GTT TGG TGG ACT ACA CAC TGG GTT GGT CGA AAT GGT GGG GAT CTT	394
Lys Val Trp Trp Thr Thr His Trp Val Gly Arg Asn Gly Gly Asp Leu	
100 105 110	
GAA TCG GAG ACT CAG ATT GTG ATC CTT GAG AAG TCA GAT TCT GGT CGA	442
Glu Ser Glu Thr Gln Ile Val Ile Leu Glu Lys Ser Asp Ser Gly Arg	
115 120 125	
CCG TAT GTT TTC CTT CTT CCG ATC GTT GAG GCA CCG TTC CGA ACC TCG	490
Pro Tyr Val Phe Leu Leu Pro Ile Val Glu Gly Pro Phe Arg Thr Ser	
130 135 140 145	
ATT CAG CCT GGG GAT GAT GAC TTT CTC GAT GTT TGT GTC GAG AGT GGT	538
Ile Gln Pro Gly Asp Asp Asp Phe Val Asp Val Cys Val Glu Ser Gly	
150 155 160	
TCG TCG AAA GTT GTT GAT GCA TCG TTC CGA AGT ATG TTG TAT CTT CAT	586
Ser Ser Lys Val Val Asp Ala Ser Phe Arg Ser Met Leu Tyr Leu His	
165 170 175	
GCT GGT GAT GAT CCG TTT GCA CTT GTT AAA GAG GCG ATG AAG ATC GTG	634
Ala Gly Asp Asp Pro Phe Ala Leu Val Lys Glu Ala Met Lys Ile Val	
180 185 190	
AGG ACC CAT CTT GGA ACT TTT CGC TTG TTG GAG GAG AAG ACT CCA CCA	682
Arg Thr His Leu Gly Thr Phe Arg Leu Leu Glu Glu Lys Thr Pro Pro	
195 200 205	
GGT ATC GTG GAC AAA TTC GGT TGG TGC ACG TGG GAC GCG TTT TAC CTA	730
Gly Ile Val Asp Lys Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr Leu	
210 215 220 225	
ACG GTT CAT CCA CAG GGC GTA ATA GAA GGC GTG AGG CAT CTC GTC GAC	778
Thr Val His Pro Gln Gly Val Ile Glu Gly Val Arg His Leu Val Asp	
230 235 240	
GGC GGT TGT CCT CCC GGT TTA GTC CTA ATC GAC GAT GGT TGG CAA TCC	826
Gly Gly Cys Pro Pro Gly Leu Val Leu Ile Asp Asp Gly Trp Gln Ser	
245 250 255	
ATC GGA CAC GAT TCG GAT CCC ATC ACC AAA GAA GGA ATG AAC CAA ACC	874
Ile Gly His Asp Ser Asp Pro Ile Thr Lys Glu Gly Met Asn Gln Thr	
260 265 270	
GTC GCC GGC GAG CAA ATC CCC TGC CGT CTT TTG AAA TTC CAA GAG AAT	922
Val Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys Arg Leu Leu Lys Phe Gln Glu Asn	
275 280 285	
TAC AAA TTC CGT GAC TAC GTC AAT CCC AAG GCC ACC GCC CCC CGA GCC	970

Tyr Lys Phe Arg Asp Tyr Val Asn Pro Lys Ala Thr Gly Pro Arg Ala				
290	295	300	305	
GGC CAG AAG GGG ATG AAG CCG TTT ATA GAT GAA CTC AAA GGA GAG TTT	1018			
Gly Gln Lys Gly Met Lys Ala Phe Ile Asp Glu Leu Lys Gly Glu Phe				
310	315	320		
AAG ACT GTG GAG CAT GTT TAT GTT TGG CAT GCT TTG TGT GGA TAT TGG	1066			
Lys Thr Val Glu His Val Tyr Val Trp His Ala Leu Cys Gly Tyr Trp				
325	330	335		
GGT GGC CTT CGC CCG CAG GTG CCT GGC TTG CCT GAG GCA CGT GTG ATT	1114			
Gly Gly Leu Arg Pro Gln Val Pro Gly Leu Pro Glu Ala Arg Val Ile				
340	345	350		
CAG CCA GTG CTT TCA CCA GGG CTG CAG ATG ACG ATG GAG GAT TTG GCG	1162			
Gln Pro Val Leu Ser Pro Gly Leu Gln Met Thr Met Glu Asp Leu Ala				
355	360	365		
GTG GAT AAG ATT GTT CTT CAT AAG GTC GGG CTG GTC CCG CCG GAG AAG	1210			
Val Asp Lys Ile Val Leu His Lys Val Gly Leu Val Pro Pro Glu Lys				
370	375	380	385	
GCT GAG GAG ATG TAC GAA GGA CTT CAT GCT CAT TTG GAA AAA GTT GGG	1258			
Ala Glu Glu Met Tyr Glu Gly Leu His Ala His Leu Glu Lys Val Gly				
390	395	400		
ATC GAC GGT GTT AAG ATT GAC GTT ATC CAC CTA TTG GAG ATG TTG TGT	1306			
Ile Asp Gly Val Lys Ile Asp Val Ile His Leu Leu Glu Met Leu Cys				
405	410	415		
GAA GAC TAT GGA GGG AGA GTG GAT TTG GCA AAG GCA TAT TAC AAA GCA	1354			
Glu Asp Tyr Gly Gly Arg Val Asp Leu Ala Lys Ala Tyr Tyr Lys Ala				
420	425	430		
ATG ACC AAA TCA ATA AAT AAA CAT TTT AAA GGA AAT GGA GTC ATT GCA	1402			
Met Thr Lys Ser Ile Asn Lys His Phe Lys Gly Asn Gly Val Ile Ala				
435	440	445		
AGT ATG GAA CAT TGT AAC GAC TTC ATG TTC CTT GCC ACG GAA GCT ATC	1450			
Ser Met Glu His Cys Asn Asp Phe Met Phe Leu Gly Thr Glu Ala Ile				
450	455	460	465	
TCT CTT GGT CGT GTT GGT GAT GAC TTT TGG TGC ACG GAC CCC TCT GGT	1498			
Ser Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Thr Asp Pro Ser Gly				
470	475	480		
GAT CCA AAC GGT ACG TTT TGG CTC CAA GGA TGT CAC ATG GTT CAT TGT	1546			
Asp Pro Asn Gly Thr Phe Trp Leu Gln Gly Cys His Met Val His Cys				
485	490	495		
GCC AAC GAC AGC TTG TGG ATG GGG AAC TTC ATC CAC CCT GAC TGG GAT	1594			
Ala Asn Asp Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile His Pro Asp Trp Asp				

500	505	510	
ATG TTC CAA TCC ACC CAC CCT TGT GCC GCC TTC CAT GCT GCC TCT CGA			1642
Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Ala Phe His Ala Ala Ser Arg			
515	520	525	
GCC ATC TCT GGT GGC CCG ATC TAT GTT AGT GAT TCT GTG GGA AAG CAT			1690
Ala Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Val Ser Asp Ser Val Gly Lys His			
530	535	540	545
AAC TTT GAT CTT CTG AAA AAA CTA GTG CTT CCT GAT GGA TCG ATC CTT			1738
Asn Phe Asp Leu Leu Lys Lys Leu Val Leu Pro Asp Gly Ser Ile Leu			
550	555	560	
CGA AGT GAG TAC TAT GCA CTC CCG ACT CGC GAT TGT TTG TTT GAA GAC			1786
Arg Ser Glu Tyr Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys Leu Phe Glu Asp			
565	570	575	
CCT TTG CAT AAT GGA GAA ACT ATG CTT AAG ATT TGG AAT CTC AAC AAG			1834
Pro Leu His Asn Gly Glu Thr Met Leu Lys Ile Trp Asn Leu Asn Lys			
580	585	590	
TTC ACT GGA GTG ATT GGT GCA TTC AAC TGC CAA GGA GGA GGA TGG TGT			1882
Phe Thr Gly Val Ile Gly Ala Phe Asn Cys Gln Gly Gly Gly Trp Cys			
595	600	605	
CGT GAG ACA CGC CGC AAC CAA TGC TTT TCA CAA TAC TCA AAA CGA GTG			1930
Arg Glu Thr Arg Arg Asn Gln Cys Phe Ser Gln Tyr Ser Lys Arg Val			
610	615	620	625
ACA TCC AAA ACT AAC CCA AAA GAC ATA GAA TGG CAC AGT GGA GAA AAC			1978
Thr Ser Lys Thr Asn Pro Lys Asp Ile Glu Trp His Ser Gly Glu Asn			
630	635	640	
CCT ATC TCT ATT GAA GGC GTT AAA ACC TTT GCG CTT TAC CTC TAT CAA			2026
Pro Ile Ser Ile Glu Gly Val Lys Thr Phe Ala Leu Tyr Leu Tyr Gln			
645	650	655	
GCC AAA AAA CTT ATC CTC TCC AAG CCC TCT CAA GAT CTT GAC ATA GCT			2074
Ala Lys Lys Leu Ile Leu Ser Lys Pro Ser Gln Asp Leu Asp Ile Ala			
660	665	670	
CTT GAC CCA TTC GAA TTC GAG CTC ATC ACT GTT TCA CCA GTG ACC AAA			2122
Leu Asp Pro Phe Glu Phe Glu Leu Ile Thr Val Ser Pro Val Thr Lys			
675	680	685	
CTC ATC CAA ACT TCT CTA CAC TTT GCC CCA ATT GGG CTG GTG AAC ATG			2170
Leu Ile Gln Thr Ser Leu His Phe Ala Pro Ile Gly Leu Val Asn Met			
690	695	700	705
CTT AAC ACT AGT GGA GCC ATC CAA TCT GTG GAC TAT GAC GAT GAC CTA			2218
Leu Asn Thr Ser Gly Ala Ile Gln Ser Val Asp Tyr Asp Asp Asp Leu			
710	715	720	

AGC TCA GTC GAG ATT GGT GTC AAA GGG TGT GGT GAG ATG CGA GTA TTT	2266
Ser Ser Val Glu Ile Gly Val Lys Gly Cys Gly Glu Met Arg Val Phe	
725 730 735	
GCA TCG AAA AAA CCA AGG GCT TGT CGT ATT GAT GGG GAG GAT GTT GCG	2314
Ala Ser Lys Lys Pro Arg Ala Cys Arg Ile Asp Gly Glu Asp Val Gly	
740 745 750	
TTC AAG TAT GAT CAG GAC CAA ATG GTG GTG GTT CAA GTG CCA TGG CCA	2362
Phe Lys Tyr Asp Gln Asp Gln Met Val Val Val Gln Val Pro Trp Pro	
755 760 765	
ATT GAT TCT TCA TCG GGT GGC ATT TCG GTT ATC GAG TAC TTG TTT	2407
Ile Asp Ser Ser Ser Gly Gly Ile Ser Val Ile Glu Tyr Leu Phe	
770 775 780	
TAATTTTAT TTATGTAAGC TCAATGATTG TTGTTGTTGT CGCTGTTGTT GCTATCAATG	2467
TATTTCTCTC CAAAAGAAAA TTATGTGTAA TTTGGAGACT AATTAAGTGA	2517

(2) 配列番号5の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 784 amino acids

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: SEQ ID NO:5:

Met Ala Pro Ser Phe Lys Asn Gly Gly Ser Asn Val Val Ser Phe Asp	
1 5 10 15	
Gly Leu Asn Asp Met Ser Ser Pro Phe Ala Ile Asp Gly Ser Asp Phe	
20 25 30	
Thr Val Asn Gly His Ser Phe Leu Ser Asp Val Pro Glu Asn Ile Val	
35 40 45	
Ala Ser Pro Ser Pro Tyr Thr Ser Ile Asp Lys Ser Pro Val Ser Val	
50 55 60	
Gly Cys Phe Val Gly Phe Asp Ala Ser Glu Pro Asp Ser Arg His Val	
65 70 75 80	
Val Ser Ile Gly Lys Leu Lys Asp Ile Arg Phe Met Ser Ile Phe Arg	
85 90 95	
Phe Lys Val Trp Trp Thr Thr His Trp Val Gly Arg Asn Gly Gly Asp	
100 105 110	
Leu Glu Ser Glu Thr Gln Ile Val Ile Leu Glu Lys Ser Asp Ser Gly	
115 120 125	
Arg Pro Tyr Val Phe Leu Leu Pro Ile Val Glu Gly Pro Phe Arg Thr	
130 135 140	

Ser Ile Gln Pro Gly Asp Asp Asp Phe Val Asp Val Cys Val Glu Ser
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Lys Val Val Asp Ala Ser Phe Arg Ser Met Leu Tyr Leu
 165 170 175
 His Ala Gly Asp Asp Pro Phe Ala Leu Val Lys Glu Ala Met Lys Ile
 180 185 190
 Val Arg Thr His Leu Gly Thr Phe Arg Leu Leu Glu Glu Lys Thr Pro
 195 200 205
 Pro Gly Ile Val Asp Lys Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr
 210 215 220
 Leu Thr Val His Pro Gln Gly Val Ile Glu Gly Val Arg His Leu Val
 225 230 235 240
 Asp Gly Gly Cys Pro Pro Gly Leu Val Leu Ile Asp Asp Gly Trp Gln
 245 250 255
 Ser Ile Gly His Asp Ser Asp Pro Ile Thr Lys Glu Gly Met Asn Gln
 260 265 270
 Thr Val Ala Gly Glu Gln Met Pro Cys Arg Leu Leu Lys Phe Gln Glu
 275 280 285
 Asn Tyr Lys Phe Arg Asp Tyr Val Asn Pro Lys Ala Thr Gly Pro Arg
 290 295 300
 Ala Gly Gln Lys Gly Met Lys Ala Phe Ile Asp Glu Leu Lys Gly Glu
 305 310 315 320
 Phe Lys Thr Val Glu His Val Tyr Val Trp His Ala Leu Cys Gly Tyr
 325 330 335
 Trp Gly Gly Leu Arg Pro Gln Val Pro Gly Leu Pro Glu Ala Arg Val
 340 345 350
 Ile Gln Pro Val Leu Ser Pro Gly Leu Gln Met Thr Met Glu Asp Leu
 355 360 365
 Ala Val Asp Lys Ile Val Leu His Lys Val Gly Leu Val Pro Pro Glu
 370 375 380
 Lys Ala Glu Glu Met Tyr Glu Gly Leu His Ala His Leu Glu Lys Val
 385 390 395 400
 Gly Ile Asp Gly Val Lys Ile Asp Val Ile His Leu Leu Glu Met Leu
 405 410 415
 Cys Glu Asp Tyr Gly Gly Arg Val Asp Leu Ala Lys Ala Tyr Tyr Lys
 420 425 430
 Ala Met Thr Lys Ser Ile Asn Lys His Phe Lys Gly Asn Gly Val Ile
 435 440 445
 Ala Ser Met Glu His Cys Asn Asp Phe Met Phe Leu Gly Thr Glu Ala
 450 455 460

Ile Ser Leu Gly Arg Val Gly Asp Asp Phe Trp Cys Thr Asp Pro Ser
465 470 475 480
Gly Asp Pro Asn Gly Thr Phe Trp Leu Gln Gly Cys His Met Val His
485 490 495
Cys Ala Asn Asp Ser Leu Trp Met Gly Asn Phe Ile His Pro Asp Trp
500 505 510
Asp Met Phe Gln Ser Thr His Pro Cys Ala Ala Phe His Ala Ala Ser
515 520 525
Arg Ala Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Val Ser Asp Ser Val Gly Lys
530 535 540
His Asn Phe Asp Leu Leu Lys Lys Leu Val Leu Pro Asp Gly Ser Ile
545 550 555 560
Leu Arg Ser Glu Tyr Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys Leu Phe Glu
565 570 575
Asp Pro Leu His Asn Gly Glu Thr Met Leu Lys Ile Trp Asn Leu Asn
580 585 590
Lys Phe Thr Gly Val Ile Gly Ala Phe Asn Cys Gln Gly Gly Gly Trp
595 600 605
Cys Arg Glu Thr Arg Arg Asn Gln Cys Phe Ser Gln Tyr Ser Lys Arg
610 615 620
Val Thr Ser Lys Thr Asn Pro Lys Asp Ile Glu Trp His Ser Gly Glu
625 630 635 640
Asn Pro Ile Ser Ile Glu Gly Val Lys Thr Phe Ala Leu Tyr Leu Tyr
645 650 655
Gln Ala Lys Lys Leu Ile Leu Ser Lys Pro Ser Gln Asp Leu Asp Ile
660 665 670
Ala Leu Asp Pro Phe Glu Phe Glu Leu Ile Thr Val Ser Pro Val Thr
675 680 685
Lys Leu Ile Gln Thr Ser Leu His Phe Ala Pro Ile Gly Leu Val Asn
690 695 700
Met Leu Asn Thr Ser Gly Ala Ile Gln Ser Val Asp Tyr Asp Asp Asp
705 710 715 720
Leu Ser Ser Val Glu Ile Gly Val Lys Gly Cys Gly Glu Met Arg Val
725 730 735
Phe Ala Ser Lys Lys Pro Arg Ala Cys Arg Ile Asp Gly Glu Asp Val
740 745 750
Gly Phe Lys Tyr Asp Gln Asp Gln Met Val Val Val Gln Val Pro Trp
755 760 765
Pro Ile Asp Ser Ser Ser Gly Gly Ile Ser Val Ile Glu Tyr Leu Phe
770 775 780

(2) 配列番号 6 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 23 base pairs
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列: SEQ ID NO:6:

TTYTAYCTBA CHGTNCAYCC TCA

23

(2) 配列番号 7 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 23 base pairs
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列: SEQ ID NO:7:

TTYTAYCTBA CHGTNCAYCC CCA

23

(2) 配列番号 8 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 23 base pairs
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列: SEQ ID NO:8:

TTYTAYCTBA CHGTNCAYCC ACA

23

(2) 配列番号 9 の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 23 base pairs
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列: SEQ ID NO:9:

TTYTAYCTBA CHGTNCAYCC GCA

23

(2) 配列番号10の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 26 base pairs
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号:
- (B) 存在位置:

(D) 他の情報: 6番目及び11番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列: SEQ ID NO:10:

GARGGNGTNM GNCAYCTRGT NGAYGG

26

(2) 配列番号11の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 26 base pairs
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号:
- (B) 存在位置:

(D) 他の情報: 6番目及び11番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列: SEQ ID NO:11:

GARGGNGTNM GNCAYCTYGT NGAYGG

26

(2) 配列番号12の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 26 base pairs
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号:

(B) 存在位置:

(D) 他の情報: 6番目及び11番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列: SEQ ID NO:12:

GARGGNGTNM GNCAYTTRGT NGAYGC

26

(2) 配列番号13の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 26 base pairs

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:

(B) 存在位置:

(D) 他の情報: 3番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列: SEQ ID NO:13:

GTNGGNTGYT TYGTNGGYTT YGAYGC

26

(2) 配列番号14の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 26 base pairs

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:

(B) 存在位置:

(D) 他の情報: 3番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列: SEQ ID NO:14:

GTNGGNTGYT TYGTNGGRTT YGAYGC

26

(2) 配列番号15の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 29 base pairs

(B) 配列の型: 核酸

- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
- (ix) 配列の特徴:
 - (A) 特徴を表す記号:
 - (B) 存在位置:
 - (D) 他の情報: 9番目及び11番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列: SEQ ID NO:15:
TTYGAYGCNT CNGARCCHGA YTCDCGNCA

29

(2) 配列番号16の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 30 base pairs
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号:
- (B) 存在位置:

(D) 他の情報: 9番目及び11番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列: SEQ ID NO:16:
TTYGAYGCNT CNGARCCHGA YTC DAGYCA Y

30

(2) 配列番号17の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 20 base pairs
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列: SEQ ID NO:17:

GAYCARGAYC TRATGGTNGT

20

(2) 配列番号18の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 26 base pairs
- (B) 配列の型: 核酸

- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
- (ix) 配列の特徴:
 - (A) 特徴を表す記号:
 - (B) 存在位置:
 - (D) 他の情報: 6番目及び15番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列: SEQ ID NO:18:
CCRTCNACYA GRTGNCKNAC NCCYTC

26

(2) 配列番号19の配列の情報:

- (i) 配列の性質:
 - (A) 配列の長さ: 26 base pairs
 - (B) 配列の型: 核酸
 - (C) 鎖の数: 一本鎖
 - (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
- (ix) 配列の特徴:
 - (A) 特徴を表す記号:
 - (B) 存在位置:
 - (D) 他の情報: 6番目及び15番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列: SEQ ID NO:19:
CCRTCNACRA GRTGNCKNAC NCCYTC

26

(2) 配列番号20の配列の情報:

- (i) 配列の性質:
 - (A) 配列の長さ: 26 base pairs
 - (B) 配列の型: 核酸
 - (C) 鎖の数: 一本鎖
 - (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
- (ix) 配列の特徴:
 - (A) 特徴を表す記号:
 - (B) 存在位置:
 - (D) 他の情報: 6番目及び15番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列: SEQ ID NO:20:
CCRTCNACYA TRTGNCKNAC NCCYTC

26

(2) 配列番号21の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 29 base pairs
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:

(B) 存在位置:

(D) 他の情報: 3番目及び18番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列: SEQ ID NO:21:

TGNCGHGART CDGGYTCNGA NGCRTCRAA

29

(2) 配列番号22の配列の情報:

(i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 30 base pairs
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:

(B) 存在位置:

(D) 他の情報: 19番目のヌクレオチドNはイノシンを、他のNは、A、G、C又はTを表す。

(xi) 配列: SEQ ID NO:22:

RTGRCTHGAR TCDGGYTCNG ANGRTCRAA

30

請求の範囲

1. 下記性質を有するラフィノース合成酵素。
 - (1) 作用及び基質特異性：スクロースとガラクトキノールからラフィノースを生成する。
 - (2) 至適pH：約6～8
 - (3) 至適温度：約35～40℃
 - (4) 分子量：
 - ①ゲルろ過クロマトグラフィーにより測定される分子量：約75kDa～95kDa
 - ②ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定される分子量：約90kDa～100kDa
 - ③還元条件下におけるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定される分子量：約90kDa～100kDa
 - (5) 阻害：
ヨードアセトアミド、N-エチルマレイミド、ミオイノシトールにより阻害される。
2. アミノ酸配列中に、配列表の配列番号1～3に示す各アミノ酸配列を含む請求項1記載のラフィノース合成酵素。
3. 下記(A)又は(B)に示すタンパク質であるラフィノース合成酵素。
 - (A) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。
 - (B) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、スクロースとガラクトキノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質。
4. スクロース及びガラクトキノールに請求項1～3のいずれか一項に記載のラフィノース合成酵素を作用させてラフィノースを生成させることを特徴とするラフィノースの製造方法。
5. 請求項1～3のいずれか一項に記載のラフィノース合成酵素をコードするDNA。
6. 下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNA。
 - (A) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。
 - (B) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、スクロースとガラクトキノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質。
7. 下記(a)又は(b)に示すDNAである請求項5記載のDNA。
 - (a) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号57～2408からなる塩基配列を含むDNA。
 - (b) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号57～2408からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつスクロースとガラクトキノールからラフィノースを生成する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

8. ラフィノース合成酵素遺伝子又はその一部と、植物細胞で発現可能な転写制御領域とを含むキメラ遺伝子。

9. 前記ラフィノース合成酵素遺伝子が、請求項5～7のいずれか一項に記載のDNAである請求項8記載のキメラ遺伝子。

10. 前記転写制御領域が、前記DNAのコード鎖に相補的な配列を有するアンチセンスRNAを発現するように前記DNAに連結されている請求項8又は9記載のキメラ遺伝子。

11. 請求項8～10のいずれか一項に記載のキメラ遺伝子で形質転換された植物。

12. 請求項8～10のいずれか一項に記載のキメラ遺伝子で植物を形質転換し、この遺伝子を植物細胞内で発現させることにより、前記植物のラフィノース族オリゴ糖含量を変化させる方法。

要約書

キュウリより精製したラフィノース合成酵素をスクロースとガラクトノールに作用させることにより、効率よくラフィノースを生成させた。また、ラフィノース合成酵素遺伝子と植物で発現可能な制御領域を有するキメラ遺伝子で植物を形質転換することにより、内在性ラフィノース合成酵素の機能を制御し、ラフィノース族オリゴ糖の低減下した植物を作出した。

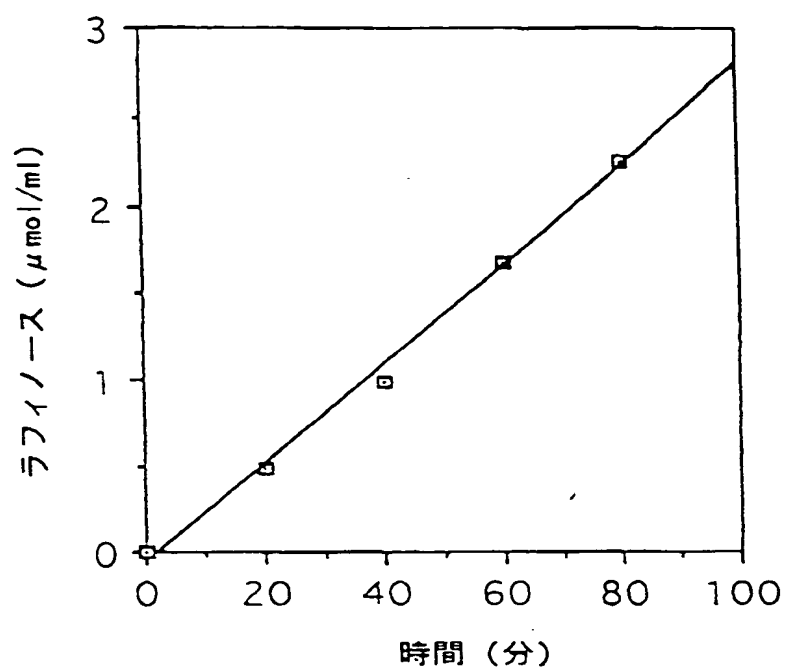


FIG. 1

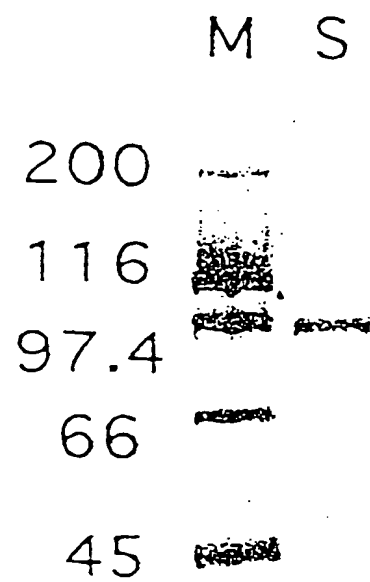


FIG. 2

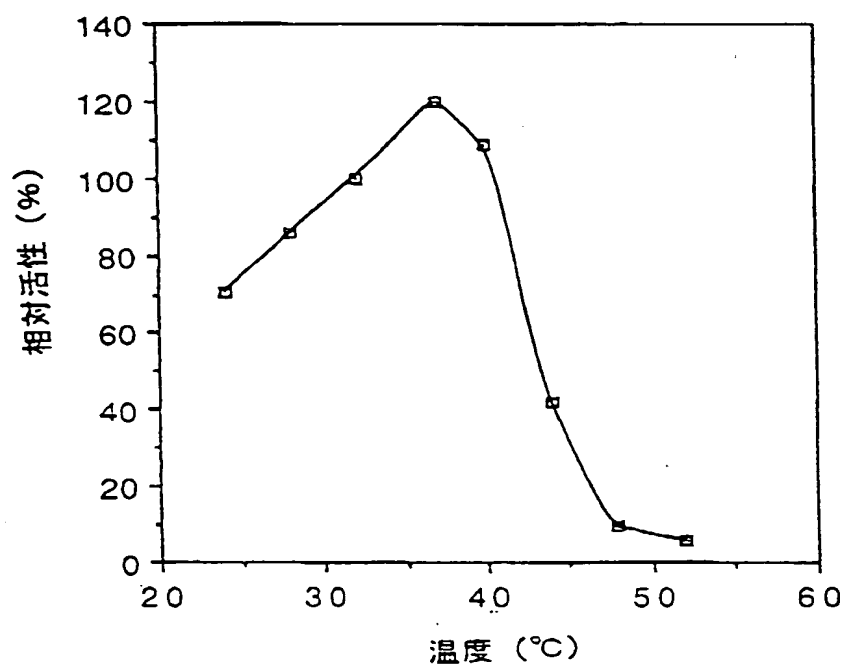


FIG. 3

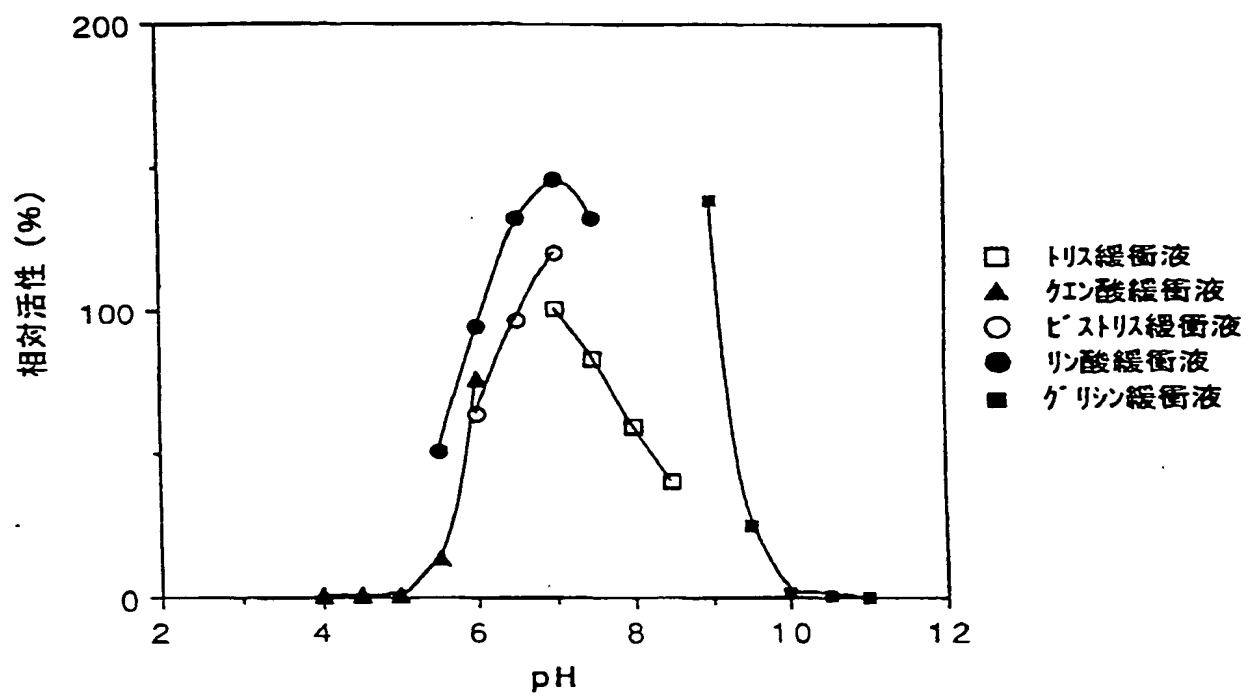


FIG. 4

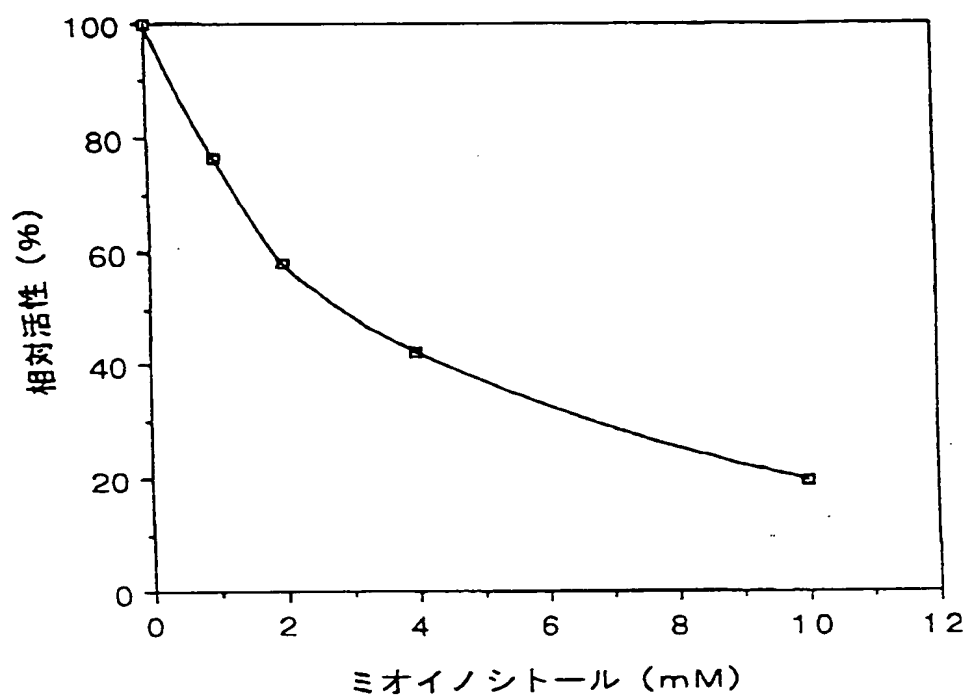


FIG. 5

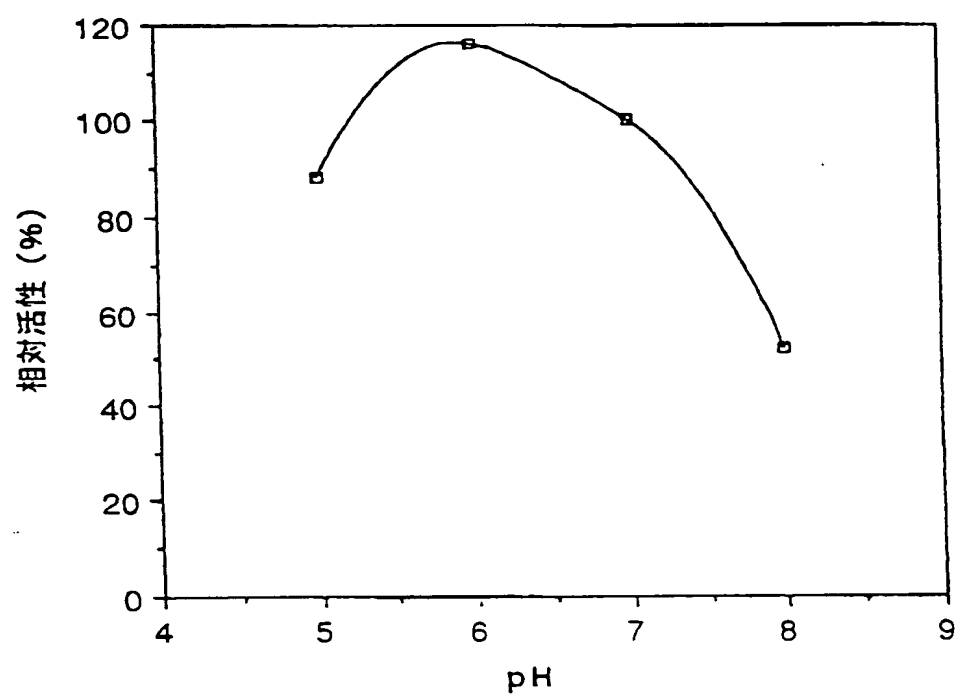


FIG. 6

(配列番号6) A1 5'- TTY TAY CTB ACI GTN CAY CCT CA -3'
 (配列番号7) A2 5'- TTY TAY CTB ACI GTN CAY CCC CA -3' B1 5'- GAR GCN GTN MGN CAY CTR GTN GAY CG -3' (配列番号10)
 (配列番号8) A3 5'- TTY TAY CTB ACI GTN CAY CCA CA -3' B2 5'- GAR GCN GTN MGN CAY CTV GTN GAY CG -3' (配列番号11)
 (配列番号9) A4 5'- TTY TAY CTB ACI GTN CAY CCG CA -3' B3 5'- GAR GCN GTN MGN CAY TTR GTN GAY CG -3' (配列番号12)
 Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr Leu Thr Val His Pro Gln Gly Val Ile Glu Gly Val Arg His Leu Val Asp Gly Gly Cys
 (配列番号1) : (配列番号18) 3'- CTV CCN CAN KCI GTR GAY CAI CTR CC -5' B'1
 (配列番号19) 3'- CTV CCN CAN KCI GTR GAR CAI CTR CC -5' B'2
 (配列番号20) 3'- CTV CCN CAN KCI GTR TAY CAI CTR CC -5' B'3

D1 5'- TTY GAY GCN TCN GAR CCH GAY TCD CCN CA -3' (配列番号15)
 D2 5'- TTY GAY GCN TCN GAR CCH GAY TCD AGY CAY -3' (配列番号16)
 C1 5'- GTN GCN TGY TTY GTN GGY TTY GAY GC -3' (配列番号13)
 C2 5'- GTN GCN TGY TTY GTN GGR TTY GAY GC -3' (配列番号14)
 Pro Val Ser Val Gly Cys Phe Val Gly Phe Asp Ala Ser Glu Pro Asp Ser Arg His
 3'- AAR CTR CCN AGI CTV GGD CTR AGN GCI GT -5' D'1 (配列番号21)
 3'- AAR CTR CCN AGI CTV GGD CTR AGH TCR GTR -5' D'2 (配列番号22)

E 5'- GAY GAR GAY CTR ATG GTN GT -3' (配列番号17)
 Tyr Asp Gln Asp Gln Met Val Val Val Gln Val Pro Trp Pro
 (配列番号3)

FIG. 7